

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Exploração da diversidade bacteriana de esponjas marinhas por
abordagens dependente e independente de cultivo**

Danilo Tosta Souza

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor
em Ciências. Área de concentração: Microbiologia
Agrícola

**Piracicaba
2016**

Danilo Tosta Souza
Engenheiro Agrônomo

**Exploração da diversidade bacteriana de esponjas marinhas por
abordagens dependente e independente de cultivo**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **ITAMAR SOARES DE MELO**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor
em Ciências. Área de concentração: Microbiologia
Agrícola

Piracicaba
2016

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Souza, Danilo Tosta

Exploração da diversidade bacteriana de esponjas marinhas por abordagens dependente e independente de cultivo / Danilo Tosta Souza. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2016.
202 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Simbiontes 2. Fungicidas 3. Taxonomia polifásica 4. *Pythium* spp. 5. Associações bacterianas 6. Interações bacterianas 7. Especificidade I. Título

CDD 593.4
S731e

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICO

A minha noiva Marília.

OFEREÇO

Aos meus pais, Edésio e Maria e

irmãos Karine e Dedeco.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meus caminhos e tornar tudo possível.

À Universidade de São Paulo e ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola por todos os ensinamentos ao longo destes quatro anos.

À Embrapa Meio Ambiente pela oportunidade e total disponibilização de recursos para conclusão deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas de estudo concedidas.

Ao revisor da FAPESP por todas as valiosas sugestões ao longo de todo o processo para conclusão desta Tese.

Ao CNPq pelo apoio financeiro através do projeto Arquipélago e Ilhas Oceânicas – Chamada 39/2012.

À Marinha do Brasil pelo apoio logístico para a expedição ao Arquipélago de São Pedro e São Paulo.

Ao Professor Dr. Itamar Soares de Melo por acreditar no meu trabalho, pela orientação e por seu exemplo de profissionalismo, sabedoria, otimismo, amizade, dedicação e perseverança durante a realização deste trabalho.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola pelos inúmeros serviços prestados, ensinamentos e inestimáveis contribuições para minha vida pessoal e profissional.

A todos professores que me introduziram no mundo científico, desde o início da graduação: Dr. Rodrigo Pires Nascimento, Dr. Abelmon da Silva Gesteira, Dra. Ana Cristina Fermino Soares, Dr. Jorge Teodoro de Souza, Dra. Denise Mara Soares Bazzolli, Dra. Maria Catarina Megumi Kasuya e Dra. Marisa Vieira de Queiroz.

Aos funcionários da Embrapa Meio Ambiente pelos inúmeros serviços prestados e momentos de descontração: Márcia Parma, Rosely Nascimento, João Luiz, Dra. Tatiana Rigamonte, Elke Vilela, Anamaria Dentzien, Dr. Rodrigo Mendes,

Dr. Claudio Jonsson, Sueli Dominicale, Rodrigo Castanha, Henrique Vieira e Cleonice Arruda.

A todos os parceiros e amigos que auxiliaram, moldaram e divulgaram esta pesquisa: Camila Cristiane Pansa, Roseli de Cássia de Almeida Pamplona, Jorge Fernandes Albano de Moraes, Dr. Fábio Sérgio Paulino da Silva, Dr. Rodrigo Taketani, Dra. Sonia Queiroz, Dr. Eduardo Crevelin, Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes, Dra. Suikinai Nobre Santos, Dr. Tiago Domingues Zucchi, Dra. Vanessa Kavamura, Dr. Rafael Vasconcelos, Dr. Diego Genuário e Dr. Fernando Coreixas de Moraes.

A todos os colegas de Mestrado e Doutorado, pela convivência durante as disciplinas, pelos trabalhos e estudos em grupo e, principalmente, pela inestimável amizade.

Aos meus pais, Edésio Luz Souza e Maria do Carmo Vieira Tosta Souza, pelo amor incondicional e pela compreensão nos momentos de ausência.

Aos meus irmãos, Edésio Sobrinho e Karine Tosta, pela amizade, confiança e lealdade.

À minha querida sobrinha, Ísis Tosta, por todo carinho e positividade.

Aos meus avós paternos, Sebastião Dantas Souza (*in memorian*) e Eulália Luz Souza; e maternos, José Vieira Tosta (*in memorian*) e Altamiranda Tosta Sampaio, pelo exemplo de família e dedicação.

Aos meus tios-avós, Edésio Dantas Souza (*in memorian*) e Olinda Pinto Souza (*in memorian*), por todo amor, carinho e sabedoria.

A todos os meus familiares, por acreditarem em mim e entenderem minha ausência.

À minha noiva Marília Rodrigues, pelo carinho, amor, apoio e compreensão nos momentos de ausência.

E, finalmente, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

Danilo Tosta

*“O mais importante de tudo é
nunca deixar de se perguntar.*

*A curiosidade tem sua própria
razão de existir”.*

Albert Einstein

*“Existem muitas hipóteses na
ciência que estão erradas.*

Isso é perfeitamente aceitável.

*Elas são a abertura para achar
as hipóteses que estão certas”.*

Carl Sagan

SUMÁRIO

RESUMO	15
ABSTRACT	17
LISTA DE FIGURAS	19
LISTA DE TABELAS	27
1 INTRODUÇÃO	29
2 OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo principal	31
2.2 Objetivos específicos	31
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	33
3.1 O filo porifera	33
3.2 Anatomia e fisiologia de esponjas	34
3.3 Associação bactéria-esponja: abundância, especificidade e diversidade	37
3.4 Processos de aquisição, transmissão e manutenção da comunidade bacteriana	40
3.5 Relação entre a filogenia do hospedeiro e comunidades microbianas	43
3.6 Papeis funcionais que bactérias desempenham na esponja hospedeira	45
3.7 Cultivo de bactérias marinhas e potencial de compostos bioativos para agrobiotecnologia	48
Referências.	52
4 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO BACTERIANA DE ESPONJAS MARINHAS REVELA INFLUÊNCIAS DA FILOGENIA DO HOSPEDEIRO E O AMBIENTE	69
Resumo	69
Abstract	69
4.1 Introdução	70
4.2 Material e métodos	72
4.2.1 Local de amostragem	72
4.2.2 Amostragem de esponjas e água do mar	74
4.2.3 Análise da comunidade bacteriana usando sequenciamento do gene 16S rRNA	74
4.2.4 Processamento de sequências e assinaturas taxonômicas	75
4.2.5 Análises estatística dos dados de sequenciamento	76

4.2.6 Análise funcional de comunidades bacterianas a partir de dados do gene 16S rRNA	76
4.3 Resultados	77
4.3.1 Identificação e relações filogenéticas das esponjas	77
4.3.2 Composição da comunidade bacteriana baseada em análises de sequências do gene 16S rRNA	79
4.3.3 Relações entre a filogenia do hospedeiro e comunidades bacterianas.....	81
4.3.4 Mais utos são compartilhadas entre esponjas do mesmo grupo taxonômico ..	82
4.3.5 Inferência funcional em esponjas e água do mar	87
4.4 Discussão.....	89
Referências	96
5 CARACTERIZAÇÃO DAS COMUNIDADES BACTERIANAS ASSOCIADAS ÀS ESPONJAS <i>Didiscus oxeata</i> E <i>Scopalina ruetzleri</i> POR ABORDAGENS DEPENDENTE E INDEPENDENTE DE CULTIVO	105
Resumo.....	105
5.1 Introdução	106
5.2 Material e métodos	108
5.2.1 Amostragem e identificação das esponjas	108
5.2.2 Isolamento de bactérias heterotróficas	111
5.2.2 Classificação taxonômica dos isolados bacterianos	111
5.2.3 Sequenciamento em larga escala de fragmentos do gene 16S rRNA	112
5.2.4 Controle de qualidade e assinaturas taxonômicas	113
5.2.5 Estimativa da diversidade bacteriana e análise de dados de sequenciamento	113
5.3 Resultados	114
5.3.1 Identificação taxonômica das esponjas	114
5.3.2 Análise da composição de bactérias cultivadas	115
5.3.3 Análise da riqueza e diversidade de bactérias por abordagem independente de cultivo	121
5.3.4 Caracterização da comunidade bacteriana em nível de UTOs	122
5.3.5 Sobreposição da comunidade bacteriana por análise dependente e independente de cultivo	126
5.4 Discussão.....	127
Referências	131

6 <i>Saccharopolyspora spongiae</i> sp. nov., UM NOVO ACTINOMYCETE ISOLADO DA ESPONJA MARINHA <i>Scopalina ruetzleri</i> (WIEDENMAYER, 1977).	141
Resumo	141
Abstract	141
6.1 Introdução.....	142
6.2 Material e métodos	143
6.2.1 Coleta de amostras, condições de cultivo e manutenção	143
6.2.2 Características fenotípicas	144
6.2.3 Quimiotaxonomia.....	144
6.2.4 Filogenia	145
6.2.5 Hibridização DNA-DNA	145
6.3 Resultados e discussão.....	145
Referências	155
7 BACTÉRIAS ASSOCIADAS COM ESPONJAS MARINHAS PRODUZEM DIPEPTÍDEOS COM ATIVIDADE ANTI OOMICETO	161
Resumo	161
Abstract	161
7.1 Introdução.....	162
7.2 Material e métodos	163
7.2.1 <i>Screening</i> de bactérias associadas a esponjas com potencial antagonico frente a <i>Pythium</i> spp.	163
7.2.2 Obtenção dos metabólitos secundários de bactérias.....	164
7.2.3 Avaliação da atividade anti-oomicota dos metabólitos secundários	165
7.2.4 Inibição da motilidade de zoósporos	165
7.2.5 Avaliação da atividade citotóxica.....	165
7.2.6 Fermentação em escala ampliada, obtenção do extrato bruto e cromatografia em coluna clássica.....	166
7.2.7 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) analítica e preparativa das frações bioativas	167
7.2.8 Análise das frações bioativas por espectrometria de massas (EM).....	167
7.2.9 Análise da sub-fração ativa reunida Fr 35-36 e da amostra padrão do dipeptídeo por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas	168
7.3 Resultados.....	169

7.3.1 Seleção de bactérias antagonicas	169
7.3.2 Ensaio de difusão em discos	171
7.3.3 Avaliação da motilidade de zoósporos após contato com extratos brutos ativos	171
7.3.4 Avaliação da atividade citotóxica	172
7.3.5 Estudo do perfil químico dos extratos brutos ativos	172
7.4 Discussão.....	187
Referências	191
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	197
ANEXOS	199

RESUMO

Exploração da diversidade bacteriana de esponjas marinhas por abordagens dependente e independente de cultivo

Este estudo descreve a diversidade e composição das comunidades bacterianas associadas a cinco esponjas marinhas, e o potencial destes microrganismos como produtores de substâncias bioativas com propriedades fungicidas. As esponjas vivem em simbiose com microrganismos que apresentam alto interesse ecológico, evolutivo e biotecnológico. Contudo, este sistema microbiano permanece pobremente entendido. Para totalmente compreender a biologia desses animais é necessário descrever os fatores ecológicos e evolutivos influenciando a estrutura e dinâmica de sua microbiota. Nesta tese é defendida a hipótese de que a composição taxonômica e estrutura das comunidades bacterianas se correlaciona com o parentesco filogenético de seus hospedeiros. Neste trabalho, as comunidades bacterianas associadas às esponjas *Aplysina fulva*, *Aiolochoia crassa*, *Chondrosia collectrix*, *Didiscus oxeata* e *Scopalina ruetzleri* foram examinadas usando a plataforma Ion torrent para sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. A água do mar circundante aos espécimes foram coletadas para comparações com a microbiota de esponjas. As análises detectaram um complexo e específico sistema microbiano vivendo em esponjas, com as unidades taxonômicas operacionais dominantes classificadas nos filos: Acidobacteria, Actinobacteria, Chloroflexi, Proteobacteria e Gemmatimonadetes. Apesar da ocorrência simpátrica dos espécimes, as comunidades bacterianas diferiram significativamente entre as espécies de esponjas e a água do mar. Contudo, foi observado que as comunidades bacterianas habitando esponjas filogeneticamente mais próximas (*A. fulva* e *A. crassa*) são mais similares uma para com a outra, do que quando comparado com as comunidades em um táxon mais distante filogeneticamente (*C. collectrix*). O isolamento de bactérias foi realizado nas esponjas *D. oxeata* e *S. ruetzleri*. Cinquenta e seis linhagens foram isoladas e classificadas em três filos: Actinobacteria, Proteobacteria e Firmicutes. As análises filogenéticas indicaram cinco possíveis novas espécies bacterianas. Com base na taxonomia polifásica, um dos isolados, denominado ASPSP 40, foi caracterizado como pertencente a uma nova espécie do gênero *Saccharopolyspora*, para qual o nome *Saccharopolyspora spongiae* sp. nov. foi proposto. Dois isolados bacterianos demonstraram forte atividade antagônica contra as seguintes espécies de *Pythium*: *P. aphanidermatum*, *P. graminicola* e *P. ultimum*. Os metabólitos secundários desses isolados, assim identificados como pertencentes aos gêneros *Terrabacter* sp. ASPSP 140 e *Bacillus* sp. ASPSP 434, foram identificados por LC-MS/MS como sendo uma mistura de dipeptídeos cíclicos pertencentes à classe das dicetopiperazinas (DKP). Este é o primeiro relato da atividade fungicida e, conseqüentemente, a detecção de DKP a partir do gênero *Terrabacter*.

Palavras-chave: Simbiontes; Fungicidas; Taxonomia polifásica; *Pythium* spp.; Associações bacterianas; Interações bacterianas; Especificidade

ABSTRACT

Bioprospecting the bacterial diversity of marine sponges by culture-dependent and culture-independent approaches

This study describes the diversity of associated bacterial communities to five marine sponges, and the potential of these microorganisms as producers of bioactive substances with fungicidal properties. Sponges live in symbiosis with microorganisms that have a high ecological interest, evolutionary and biotechnological. However, this microbial system remains poorly understood. To fully understand sponge biology, it is necessary to describe the ecological and evolutionary factors that influence the structure and dynamics of their microbial communities. In this work, it is supported the hypothesis that the taxonomic composition and structure of bacterial communities correlate with phylogenetic relatedness of their corresponding hosts. Bacterial communities associated with the sponges *Aplysina fulva*, *Aiolochoia crassa*, *Chondrosia collectrix*, *Didiscus oxeata* and *Scopalina ruetzleri* were examined using the Ion Torrent platform for partial sequencing of the 16S rRNA gene. Seawater surrounding specimens were collected for comparisons. The analysis detected a complex and specific microbial system living in sponges, with the operational taxonomic units dominant classified in the phyla: Acidobacteria, Actinobacteria, Chloroflexi, Proteobacteria and Gemmatimonadetes. Despite sympatric occurrence of the specimens, the studied sponges presented different bacterial compositions that differed from those observed in seawater. However, lower dissimilarities in bacterial communities were clearly observed within sponges from the same phylogenetic group (*A. fulva* and *A. crassa*). Isolation of bacteria was done from the sponges *D. oxeata* and *S. ruetzleri*. Fifty-six strains were isolated and classified into three phyla: Actinobacteria, Proteobacteria and Firmicutes. Phylogenetic analysis indicated five possible novel bacterial species. Based in a polyphasic taxonomy approach, one of the isolates denominated ASPSP 40 was identified as belonging to a novel species of the genus *Saccharopolyspora* for which the name, *Saccharopolyspora spongiae* sp. nov. has been proposed. All bacterial isolates were evaluated by their antagonisms against *Pythium* species. Two of them, *Terrabacter* sp. ASPSP 140 and *Bacillus* sp. ASPSP 434 demonstrated strong potential in inhibiting the following species *P. aphanidermatum*, *P. ultimum* and *P. graminicola*. The bioactive secondary metabolites of both, characterized by LC-MS/MS, were identified as a mixture of cyclic dipeptides belonging to the class of diketopiperazine (DKP). This is the first report of fungicidal activity, and thus the detection of DKP of the genus *Terrabacter*.

Keywords: Symbionts; Fungicides; Polyphasic taxonomy; *Pythium* spp.; Bacterial associations; Bacterial interections; Especificity

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Representação da estrutura do corpo de uma esponja marinha. **(A)** Microrganismo ambientais são mostrados em verde, enquanto microrganismos residentes no interior do mesoílo é destacado em vermelho. **(B)** Imagem de microscopia eletrônica mostrando a abundância de células microbianas dentro da câmara de coanócitos. **(C)** Imagem utilizando a técnica de DOPE-FISH revelando diferentes células microbianas encontradas no mesoílo da esponja. Fonte: Modificado de Webster e Thomas, (2016)..... 35
- Figura 2 – Representação gráfica da diversidade de grupos bacterianos frequentemente detectados em associação com esponjas marinhas. Fonte: Modificado de Webster & Taylor, (2012)..... 39
- Figura 3 - Arquipélago de São Pedro e São Paulo no Atlântico Equatorial (0 ° 55'02 "N, 29 ° 20'44" W) e aspectos *in situ* do sítio de amostragem. **A**, mapa mostrando a posição do arquipélago; **B**, imagem de satélite do ASPSP com local de amostragem na enseada (ponto amarelo); **C**, vista oeste do ASPSP; **D**, costa rochosa na enseada a 15 m de profundidade; **E**, imagem aproximada de bentos mostrando *A. fulva* e *C. collectrix* (massa amarela no centro e incrustantes preto no canto superior esquerdo, respectivamente). A e B, imagens de satélite (SIO NOAA, US Navy, NGA GEBCO) / Pro software Google Earth; C-E, fotografias *in situ* por F. Moraes..... 73
- Figura 4 - Árvore máxima verossimilhança mostrando as relações filogenéticas de sequências do fragmento do gene CO1 a partir de esponjas da subclasse Verongimorpha. Sequências geradas neste estudo são destacadas em negrito. Um total de 550 posições foram consideradas para a reconstrução filogenética. A esponja *Keratosa Darwinella oxeata* (Bergquist, 1961) foi usada como grupo externo. 78
- Figura 5 - Classificações taxonômicas nos níveis de Filo (A e B) e Classe (C e D) mostrando a abundância relativa (%) de sequências do gene de 16S rRNA das esponjas *A. crassa* (AC), *A. fulva* (AF), *C. collectrix* (CC) e amostras da água do mar (SW). O gráfico de barras representa a

contribuição de grupos bacterianos para cada réplica (n=4) (A e C) e para a média de cada tratamento (B e D). 80

Figura 6 - Análises de Coordenadas Principais (PCoA) de comunidades bacterianas de esponjas e água do mar em 97% de similaridade, baseada em agrupamento UCLUST usando distâncias (A) Bray-Curtis e (B) unweighted UniFrac. Em ambos os casos, há três principais grupos: um composto por amostras da água do mar (pontos em azul) e dois grupos correspondendo para as famílias Aplousinidae, composto por *A. crassa* e *A. fulva* (pontos em vermelho e amarelo, respectivamente) e Chondrosidae, composto por *C. collectrix* (pontos em laranja). 82

Figura 7 - **A)** Diagrama de Venn mostrando o número de UTOs compartilhadas e exclusivas de um total de 2.112 UTOs para as esponjas *A. crassa* (AC), *A. fulva* (AF), *C. collectrix* (CC) e amostras da água do mar (SW). Sessenta e cinco UTOs são compartilhadas entre todas as três esponjas e apenas 10 UTOs foram encontradas em todas as amostras. AC e AF pertencem a mesma família e compartilham mais UTOs (172) do que as outras duas comparações ((AC x CC = 41) and (AF x CC = 45)). **B)** Diagrama de Venn mostrando o número de UTOs estáveis e exclusivas de um total de 130 UTOs. Observe que apenas 5 UTOs são compartilhadas entre todas as três espécies e 8 UTOs são compartilhadas entre *A. crassa* e *A. fulva*. Enquanto que *C. collectrix* não compartilhou nenhuma UTO com as outras duas esponjas. 84

Figura 8 - Árvore filogenética mostrando relações esponja-específico para 11 UTOs (destacadas em negrito) e sequências a partir de outras esponjas marinhas retiradas do GenBank. Amostras do Oceano foram usadas como grupo externo. 85

Figura 9 - Sub-árvore a partir de uma grande reconstrução filogenética mostrando relações entre 4 OTUs (destacadas em negrito) com outras sequências relacionadas a amostras ambientais (coral, sedimento e água do mar) retiradas do GenBank. 86

Figura 10 - Sub-árvore a partir de uma grande reconstrução filogenética mostrando agrupamentos *Aplysina*-específico de duas UTOs (denovo1958 e denovo 8714) relacionadas para Gammaproteobacteria e *Synechococcus* recuperados de *Aplysina fulva* neste estudo. Um agrupamento contém

sequências colhidas a partir da mesma espécie de esponjas coletada na costa Brasileira. O outro agrupamento contém outra espécie de esponja co-genérica a partir da costa do Caribe. 87

Figura 11 - Análise de Coordenadas Principais (PCA) a partir de dados de ortólogos KEGG indicando diferentes estratégias metabólicas entre esponjas e água do mar. (AF) é representado em quadrados amarelo; (AC) círculos em vermelho; (CC) triângulos em cinza e (SW) losangos em azul. O software STAMP foi utilizado para aplicar a estatística ANOVA com teste *post-hoc* Tukey-Kramer corrigido por Benjamini-Hochberg. 88

Figura 12 - Diferenças nas médias proporcionais de metagenomas preditos a partir de esponjas e água do mar. O software STAMP foi usado para construção da figura..... 89

Figura 13 - Arquipélago de São Pedro e São Paulo no Atlântico Equatorial (0 ° 55'02 "N, 29 ° 20'44" O) e aspectos *in situ* dos sítios de amostragem. **A**, imagem tirada do cais mostrando a enseada; **B**, imagem de satélite do ASPSP com os locais de amostragem (enseada, ponto amarelo; piscina de maré, ponto vermelho; paredão oeste das ilhas Belmonte e Barão de Teffé, ponto verde); **C**, vista da enseada, com destaque para o laboratório; **D**, imagem obtida da esponja incrustante *S. ruetzleri*; **E**, mergulho autônomo no paredão oeste das ilhas Belmonte e Barão de Teffé; **F**, imagem aproximada da esponja *D. oxeata*. B, imagen de satélite (SIO NOAA, US Navy, NGA GEBCO) / Pro software Google Earth; A, C-F, fotografias *in situ* por R. Taketani. 110

Figura 14 - Árvore Neighbor-Joining mostrando as relações filogenéticas de sequências do fragmento do gene CO1 de esponjas da subclasse Heteroscleromorpha. Sequências geradas neste estudo são destacadas com um círculo e quadrado preenchidos em preto. Um total de 571 posições foram consideradas para a reconstrução filogenética. A esponja Keratosa *Ircinia felix* foi usada como grupo externo..... 115

Figura 15 – Análise filogenética de sequências parciais do gene 16S rRNA para linhagens pertencentes ao filo Actinobacteria. O método de Neighbor-Joining foi utilizado para a inferência filogenética. Círculos vermelhos e azuis representam linhagens isoladas das esponjas *S. ruetzleri* e *D. oxeata*, respectivamente. Círculos em preto representam linhagens isoladas de

ambientes aquáticos depositadas no GenBank. Os valores de reamostragem acima de 50 % são apresentados em cada nó..... 119

Figura 16 – Análise filogenética de sequências parciais do gene 16S rRNA para linhagens pertencentes aos filos Proteobacteria e Firmicutes. O método de máxima verossimilhança foi utilizado para a inferência filogenética. Círculos vermelhos e azuis representam linhagens isoladas das esponjas *S. ruetzleri* e *D. oxeata*, respectivamente. Círculos em preto representam sequências retiradas do GenBank, as quais foram detectadas em ambientes aquáticos, enquanto círculos verdes representam sequências detectadas em invertebrados marinhos (esponjas, corais ou moluscos). Os valores de reamostragem acima de 50 % são apresentados em cada nó. 120

Figura 17 – Medidas de alfa diversidade bacteriana obtidas para amostras das esponjas hospedeiras e água do mar. A elaboração da figura e os cálculos foram realizados usando o programa R carregado com o pacote de software Phyloseq..... 122

Figura 18 - Classificações taxonômicas nos níveis de filo e classe mostrando a abundância relativa de sequências do gene 16S rRNA detectadas em *S. ruetzleri*, *D. oxeata* e amostras da água do mar. O gráfico representa a contribuição de grupos bacterianos após a média para cada habitat..... 123

Figura 19 - (A) Escalonamento multidimensional não métrico (nMDS) da estrutura da comunidade bacteriana de amostras de *D. oxeata*, representada em círculos amarelos; *S. ruetzleri*, em vermelho; e água do mar, em azul. A ordenação nMDS foi baseada na medida de dissimilaridade Bray-Curtis. (B) Diagramas de Venn mostrando o número de UTOs compartilhadas e exclusivas de um total de 4. 169 UTOs detectadas em todo o conjunto de dados. 125

Figura 20 - Diferença entre grupos bacterianos dominantes para os espécimes das esponjas *D. oxeata* e *S. ruetzleri*. Comparações entre as duas espécies de esponjas revelaram onze grupos bacterianos diferencialmente dominantes entre esponjas de AAM e BAM. 126

Figura 21 - Eletromicrografia de varredura da linhagem ASPSP 40^T, crescida em meio *International Streptomyces Project* – ISP 2, durante 21 dias a 28 °C.

- (A) Cadeia linear de esporos e hifas aéreas. (B – C) É mostrado o micélio extensivamente ramificado..... 146
- Figura 22 - Árvore Neighbor-Joining mostrando a posição filogenética da linhagem ASPSP 40^T em relação aos membros do gênero *Saccharopolyspora*. A árvore foi baseado numa comparação de ~ 1.415 pb do gene 16S rRNA. Os asteriscos indicam valores de bootstrap também recuperados nas árvores de máxima parcimônia e verossimilhança. Círculos brancos indicam que os nós correspondentes também foram recuperados na árvore de máxima verossimilhança; e círculos pretos indicam nós também recuperados na árvore de máxima parcimônia. Um grande clado contendo os membros do gênero *Amycolatopsis* foi utilizado como grupo externo (não mostrado). 150
- Figura 23 - Esquema ilustrativo do teste de antagonismo direto em placa de Petri. As linhagens fúngicas foram crescida no centro da placa e os isolados bacteriano estriado 3 dias antes..... 164
- Figura 24 - Bioensaio de antagonismo de bactérias provenientes de esponjas marinhas frente a fitopatógenos do gênero *Pythium*. Na coluna a esquerda é apresentado o antagonismo proveniente do isolado ASPSP 140, enquanto na coluna a direita é apresentado o antagonismo para o isolado ASPSP 434. As linhagens fitopatogênicas testadas estão distribuídos no sentido horizontal como: *P. aphanidermatum*; *P. ultimum* e *P. graminicola*..... 169
- Figura 25 - Inibição do crescimento de *P. aphanidermatum* por metabólitos extraídos das bactérias pré-selecionadas ASPSP 434 e 140, utilizando o método de difusão em discos..... 171
- Figura 26 - Perfil químico dos extratos brutos a) ASPSP-140 e b) ASPSP-434 obtidos por CLUE-DAD. 173
- Figura 27 - Espectro de massas dos extratos brutos a) ASPSP-434 e b) ASPSP-140. 174
- Figura 28 - Espectro de massas dos extratos brutos a) Fr 9 e b) Fr 10 obtidos via inserção direta. 175
- Figura 29 - Bioatividade dos compostos químicos presentes na fração agrupada (Fr 9-10), frente ao oomiceto fitopatogênico *P. aphanidermatum*. Na parte superior é mostrado a inibição utilizando 10 µL do extrato em DMSO 1 %

para uma concentração de 10 mg mL⁻¹. Na parte abaixo foi adicionado somente DMSO 1% sem o extrato. 176

Figura 30 - Bioatividade dos compostos químicos presentes nas frações 35 e 36 frente *P. aphanidermatum*. 177

Figura 31 - Espectros de massas das subfrações Fr 35(a) e Fr 36 (b), evidenciando a similaridade dos compostos majoritários, obtidos via inserção direta. ... 177

Figura 32 - Perfis cromatográficos obtidos por CLUE-EM das subfrações bioativas Fr 36 e Fr 35 (a e b) e subfração inativa Fr 37 (c). 178

Figura 33 – Em (a) é mostrado o espectro de massas obtido do pico cromatográfico no tR = 19,60 min e (b) o espectro de massas obtido do pico cromatográfico no tR = 19,99 min. 179

Figura 34 - Em (a) é mostrado o espectro de íons produtos obtido a partir do íon precursor de m/z 261 e (b) o espectro de íons produtos obtido a partir do íon precursor de m/z 227. 180

Figura 35 - Perfil cromatográfico obtido por CG-EM da subfração Fr 35-36. 181

Figura 36 - Em (a) é mostrado os cromatogramas TIC obtido por CG-EM da subfração Fr 35-36 e da amostra padrão do ciclo-(Leu-Fen); b) Espectro de fragmentação da subfração Fr 35-36 no tR = 15,390 min; c) Espectro de fragmentação da amostra padrão do ciclo-(Leu-Fen) no tR = 15,390 min. 182

Figura 37 - Espectro de fragmentação obtido a partir do pico cromatográfico em tR = 15,460 min na subfração Fr 35-36. 183

Figura 38 - Perfil cromatográfico obtido por CLUE-EM/EM a partir do experimento de perda neutra de 28 u da subfração Fr 35-36 (a). Perfis cromatográficos e espectros de íons produtos obtidos por CLUE-EM/EM da sub-fração Fr 35-36 (b-e) (íons precursores de m/z 227, m/z 261, m/z 247 e m/z 245, respectivamente). 184

Figura 39 - Em (a) é mostrado o espectro de íons produtos obtido a partir do íon precursor de m/z 211 e b) o espectro de íons produtos obtido a partir do íon precursor de m/z 197. 186

Figura 40 - Estrutura química das dicetopiperazinas identificadas nos extratos brutos ASPSP-434 e ASPSP-140. 186

Figura 41 - Em (A), é mostrado a bioatividade contra *P. aphanidermatum* a partir do extrato da ASPSP 140, resultante do agrupamento de subfrações após

fracionamento em coluna preparativa. B) é mostrado o livre crescimento de *P. aphanidermatum* utilizando discos impregnados com metanol e outra subfração que não apresentou bioatividade. 187

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número de sequências e UTOs após processamento dos dados das esponjas <i>Aiolochoia crassa</i> (AC), <i>Aplysina fulva</i> (AF), <i>Chondrosia collectrix</i> (CC) e amostras da água do mar (SW).....	201
Tabela 2 - Composição dos diferentes meios de cultura utilizados para o isolamento de bactérias heterotróficas associadas com esponjas marinhas.	202
Tabela 3 – Classificação taxonômica de bactérias isoladas das esponjas marinhas <i>Didiscus oxeata</i> e <i>Scopalina ruetzleri</i>	117
Tabela 4 – Comparações da composição celular do isolado ASPSP 40 ^T com espécies relacionadas do gênero <i>Saccharopolyspora</i>	148
Tabela 5 - Características fisiológicas diferenciais entre a linhagem ASPSP 40 ^T e espécies de <i>Saccharopolyspora</i> filogeneticamente mais próximas.	152
Table 6 – Avaliação da atividade de Inibição do crescimento micelial de oomicetos fitopatogênicos por bactérias isoladas de esponjas marinhas.	170
Table 7 - Porcentagem de morte e valores LC ₅₀ para ensaio de citotoxicidade a <i>A. salina</i> , a partir de extratos brutos de bactérias isoladas de esponjas.	172

1 INTRODUÇÃO

O oceano é o habitat mais promissor para a descoberta de novos microrganismos com capacidades metabólicas inéditas. Nesse ambiente, as esponjas marinhas têm recebido crescente atenção de pesquisa devido estes animais abrigarem complexas e específicas comunidades microbianas que são diferentes de qualquer outro ambiente natural. Essas associações simbióticas podem ter se formado a milhões de anos e, conseqüentemente, ao longo de sua história evolutiva pode ter selecionado para vias biossintéticas únicas.

Muitos estudos têm demonstrado a versatilidade da atividade biológica de esponjas, incluindo funções antitumoral, antiviral, antibacteriana e antifúngica, e em alguns casos, as bactérias associadas são os verdadeiros responsáveis pela bioatividade. Desde a confirmação que os simbiontes de esponjas são os verdadeiros produtores de metabólitos bioativos, estes microrganismos têm sido explorados mais intensamente, devido a facilidade de se obter um maior recurso de moléculas bioativas, ao comparado com o uso de extratos do corpo das esponjas. Estas observações, em conjunto com o fato que a esponja representa a mais antiga associação ainda existente entre procariotos e metazoários, promove as esponjas como um dos mais interessantes animais marinhos para estudos ecológicos, evolutivos e biotecnológicos.

No entanto, apesar da importância das esponjas e da grande extensão da costa brasileira, existe apenas poucos grupos de pesquisas que exploram os recursos microbianos associados a esses animais.

Como ponto de partida em projetos de bioprospecção, é de fundamental importância conhecer e entender as relações dos microrganismos e o ambiente em questão. Dessa forma, para totalmente compreender a biologia desses animais, é necessário concentrar esforços em descrever os fatores ecológicos e evolutivos influenciando a estrutura e dinâmica de suas comunidades microbianas.

Sendo assim, o primeiro objetivo desta tese foi descrever a composição e diversidade de bactérias associadas com esponjas marinhas usando sequenciamento parcial de fragmentos do gene 16S rRNA. Neste trabalho, é defendida a hipótese de que a composição taxonômica e estrutura das comunidades bacterianas se correlaciona com o parentesco filogenético de seus hospedeiros. Para este propósito, foram caracterizadas as composições e dissimilaridades de

comunidades bacterianas associadas à esponjas filogeneticamente próximas. Os espécimes foram coletados no mesmo substrato rochoso no remoto Arquipélago de São Pedro e São Paulo (ASPSP), Brasil. Para garantir uma identificação robusta das esponjas alvo, as relações filogenéticas dos hospedeiros foram acessadas usando sequenciamento do gene mitocondrial CO1.

O segundo objetivo deste trabalho foi proceder à bioprospecção de bactérias associadas às esponjas *Didiscus oxeata* e *Scopalina ruetzleri*, envolvidas na produção de compostos bioativos com propriedades fungicidas. A espectrometria de massas, associada a técnica de cromatografia, foi utilizada para acelerar a identificação dos compostos bioativos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal

Descrever a composição e diversidade de bactérias associadas às esponjas marinhas e prospectar bactérias envolvidas na produção de substâncias bioativas contra oomicetos fitopatogênicos.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Determinar a composição taxonômica e estrutura das comunidades bacterianas em esponjas espacialmente e filogeneticamente próximas;
- ✓ Caracterizar as comunidades bacterianas associadas às esponjas *Didiscus oxeata* e *Scopalina ruetzleri* por métodos dependentes e independentes de cultivo;
- ✓ Identificar, por taxonomia polifásica, possíveis novas espécies bacterianas associadas às esponjas;
- ✓ Identificar compostos anti oomiceto nos extratos de bactérias associadas às esponjas *Didiscus oxeata* e *Scopalina ruetzleri*;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O filo Porifera

Os poríferos (do latim *porus*, poro; *ferre*, portar), também conhecidos como esponjas, estão entre os ancestrais mais antigos dos organismos multicelulares, evoluindo há mais de 630 milhões de anos (LOVE et al., 2009). Estes animais são aquáticos, bentônicos e sésseis, que habitam desde oceanos tropicais (HOOPER & LÉVI, 1994) a polares (MCCLINTOCK et al., 2005), com algumas espécies encontradas em água doce (ERPENBECK et al., 2011). Vivem em águas rasas a profundas, sendo que a maior riqueza de esponjas é mais provavelmente encontrada em litorais não poluídos e habitats de sistemas recifais (VAN SOEST et al., 2012). Nestes ambientes, as esponjas podem contribuir ou mesmo dominar a fauna em termos de biomassa (BRUSCA; BRUSCA, 2002).

Apesar de sua importância evolutiva, a sistemática de poríferos é ainda pouco compreendida. Esse fato pode estar relacionado à escassez de espécimes coletados, sendo que apenas recentemente a espongiofauna passou a ser amostrada por especialistas, utilizando aparato de mergulho e fotografia submarina, o que gerou um aumento significativo de espécies conhecidas. Atualmente, o maior banco de dados desse grupo (*World Porifera Database*) reporta mais de 8.600 espécies formalmente descritas; porém, acredita-se que a verdadeira diversidade pode ser ainda maior, estimada em 17.000 espécies (VAN SOEST et al., 2012).

Como resultado dos esforços de descrição de novas espécies e particularmente, o uso de ferramentas moleculares, a sistemática de esponjas tornou-se nos últimos anos bastante dinâmica e ainda mais desafiadora. Atualmente, o filo Porifera é organizado em quatro classes taxonômicas: Calcarea, Hexactinellida, Homoscleromorpha e Demospongiae, compreendendo mais de 680 gêneros (CÁRDENAS et al., 2011; GAZAVE et al., 2012; WÖRHEIDE et al., 2012). A classe Demospongiae abrange mais de 80% de todas as esponjas, com cerca de 7.000 espécies em todo o mundo; e, em média, mais de 50 novas espécies são descritas a cada ano (MORROW; CÁRDENAS, 2015). Contudo, muitos dos grupos taxonômicos destes animais estão sob discussão, devido a novas propostas obtidas a partir de métodos de sistemática molecular (CÁRDENAS et al., 2011; MORROW et

al., 2012, 2013; REDMOND et al., 2013) os quais têm revelado numerosos grupos polifiléticos.

Recentemente, abordagens taxonômicas integrando diversos marcadores moleculares e dados fenotípicos possibilitaram o delineamento de um novo sistema de classificação e posicionamento filogenético para diversos taxa de Demospongiae (MORROW; CÁRDENAS, 2015). Contudo, existe um grande debate entre taxonomistas de esponjas quanto à formação de três ou quatro subclasses dentro da classe Demospongiae (VAN SOEST et al., 2012; WÖRHEIDE et al., 2012). Essa questão ocorre devido a incongruências entre dados morfológicos e moleculares. No último consenso, Morrow e Cárdenas (2015) recomendaram a divisão da classe Demospongiae em três subclasses: Verongimorpha, Keratosa e Heteroscleromorpha.

Entretanto, vale ressaltar que muitas das novas hipóteses filogenéticas sugeridas (ver MORROW; CÁRDENAS, 2015, para maiores detalhes), poderão sofrer mudanças devido à descrição de novas espécies e maior esforço de sequenciamento para outros marcadores moleculares. Mesmo assim, a recente proposta da divisão da classe Demospongiae em subclasses deve orientar muitos dos usuários finais deste sistema de classificação (bioquímicos, químicos, microbiologistas, ecologistas, paleontólogos, etc.) na compreensão de processos evolutivos no ecossistema marinho.

3.2 Anatomia e fisiologia de esponjas

Os poríferos possuem sistemas de tecidos estruturalmente simples e menos especializado do que outros animais. A epiderme da esponja (pinacoderme) é composta por células denominadas pinacócitos que são intercaladas com diversos orifícios microscópicos (*ostia*). Estes orifícios dão origem a um complexo sistema de canais aquíferos exclusivo do filo (VOGEL, 1977; TAYLOR et al., 2007). A água do mar passa por dentro destes canais até uma cavidade chamada espongiocela (SIMPSON, 1984; BRUSCA; BRUSCA, 2002). A parede do espongiocela é revestida por células flageladas (coanócitos) que orientam um fluxo contínuo de água até uma grande saída denominada ósculo (Figura 1).

Este processo contínuo de bombeamento da água permite que o animal filtre pequenas partículas (0,3 e 70 μm) e microrganismos presentes na coluna d'água,

principalmente para a obtenção de alimento e realização de trocas gasosas (REISWIG, 1971; PILE et al., 1996; RIBES et al., 1999a). Pequenos compostos orgânicos são também absorvidos durante a filtração por esponjas e/ou metabolizados por seus microrganismos associados (SCHMIDT, 1970; REISWIG, 1971; RIBES et al., 1999b; YAHIEL et al., 2003; GOEIJ et al., 2013; MUELLER et al., 2014). Vale ressaltar, entretanto, que existem algumas espécies carnívoras que não possuem um eficiente sistema aquífero, e ao invés disso, utilizam estruturas especializadas na superfície para captura de pequenos crustáceos (VACELET; BOURY-ESNAULT, 1995).

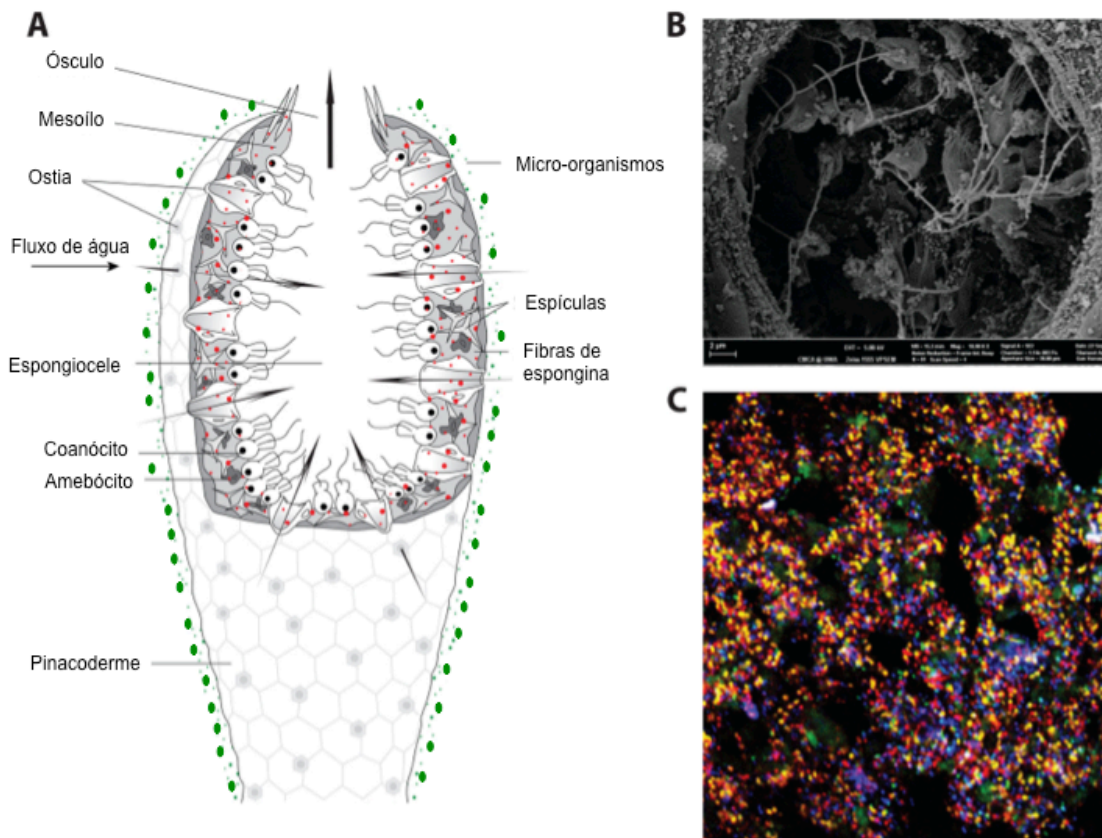


Figura 1 - Representação da estrutura do corpo de uma esponja marinha. **(A)** Microrganismo ambientais são mostrados em verde, enquanto microrganismos residentes no interior do mesoílo é destacado em vermelho. **(B)** Imagem de microscopia eletrônica mostrando a abundância de células microbianas dentro da câmara de coanócitos. **(C)** Imagem utilizando a técnica de DOPE-FISH revelando diferentes células microbianas encontradas no mesoílo da esponja

Fonte: Modificado de Webster e Thomas (2016)

Adicionalmente, as partículas de alimento, incluindo microrganismos, são transferidas para o mesoólio, a matriz gelatinosa dentro da esponja. O mesoólio é composto por vários tipos de células e elementos do esqueleto (espículas siliciosas ou calcárias) incorporados na matriz extracelular (SIMPSON, 1984; ERESKOVSKII, 2010). Adicional papel estrutural é desempenhado por um tecido colagenoso, que se polimeriza em espessas fibras denominadas espongina, encontrado exclusivamente em Desmospongiae (HOOPER; VAN SOEST, 2002). No mesoólio, células chamadas arqueócitos digerem partículas de alimento após fagocitose. Os arqueócitos são células totipotentes, capazes de se diferenciar em qualquer outro tipo de célula da esponja.

O mesoólio contém uma alta abundância de microrganismos, frequentemente encontrada em diferentes espécies de esponjas (VACELET; DONADEY, 1977; WILKINSON, 1978; FRIEDRICH et al., 1999; HOFFMANN et al., 2006; CROUÉ et al., 2013). A presença de microrganismos no processo digestivo de esponjas, indica um possível reconhecimento ou seleção de bactérias, algumas sendo destinadas como parte da dieta do animal, e outras sendo abrigadas, compondo uma comunidade residente (REISWIG, 1975; WILKINSON et al., 1981, 1984). Contudo, permanece como tópico atual de pesquisa a questão de se esta discriminação (alimento vs. simbioses) envolve o sistema imune do hospedeiro, ou apenas os microrganismos empregam mecanismos de sinalização e/ou barreiras físicas, para impedir que sejam digeridos pelo hospedeiro (HENTSCHEL et al., 2012; NGUYEN et al., 2014; WEBSTER; THOMAS, 2016).

A reprodução destes animais pode ocorrer de maneira sexuada ou assexuada. A reprodução assexuada ocorre via fragmentação, brotamento ou produção de gêmulas, sendo que todas têm um impacto muito importante na microbiologia de esponjas (TAYLOR et al., 2007). Em termos da reprodução sexuada, as esponjas podem ser hermafroditas ou gonocóricas, e exibem desenvolvimento vivíparos e ovíparos (SCHMITT et al., 2007). Os gametas masculinos saem da esponja através do ósculo, para em seguida, penetrar em outra esponja através das *ostia*, carregados pela corrente de água. Os coanócitos captam os gametas, transferindo-os para os óvulos, onde ocorre a fecundação. A maior parte das esponjas são vivíparas, sendo que após a fecundação o zigoto é retido e passa a receber nutrientes da esponja, até haver a liberação de uma larva flagelada,

que irá nadar e se fixar em um substrato, originando um novo indivíduo (AYLING, 1980).

3.3 Associação bactéria-esponja: abundância, especificidade e diversidade

A presença de microrganismos nos tecidos de esponjas tem sido revelada desde o século passado. Dosse (1939) foi um dos primeiros a descrever bactérias nos tecidos destes animais usando microscopia eletrônica. Posteriormente, Vacelet e Donadey (1977) investigaram a comunidade microbiana associada a treze espécies de esponjas e verificaram que células bacterianas estavam presentes em todas as espécies. Além disso, esses mesmos autores observaram padrões microbianos relacionados a diferenças morfológicas e fisiológicas entre as espécies de esponjas estudadas.

Após as observações de Vacelet e Donadey, tornou-se foco de pesquisa revelar os padrões microbianos encontrados em diferentes espécies de esponjas (CASSLER et al., 2007; NOYER et al., 2010; SCHMITT et al., 2011; BAYER et al., 2014a, 2014b). Neste sentido, muitos estudos têm utilizado diversas técnicas de cultivo, microscopia e biologia molecular, permitindo classificar as esponjas em dois grupos baseando-se na abundância de sua comunidade microbiana associada. Assim, estes animais foram classificados como esponjas de alta abundância microbiana (AAM), também conhecidas como bacterioesponjas (REISWIG, 1981) e esponjas de baixa abundância microbiana (BAM) (HENTSCHEL et al., 2002, 2003, 2006, 2012; GLOECKNER et al., 2014).

Esponjas de AAM hospedam diversas e abundantes comunidades que se diferem daquelas encontradas na água do mar, e que podem representar até 40% da biomassa do animal (REISWIG, 1981; HENTSCHEL et al., 2006, 2012). Frequentemente estes animais são caracterizados por baixas taxas de fluxo de água do mar e alta frequência de simbioses fotossintéticas (WEISZ et al., 2007, 2008).

Por outro lado, esponjas de BAM contêm uma reduzida abundância de microrganismos, que tendem a ser mais similares à comunidade microbiana encontrada na coluna d'água (HENTSCHEL et al., 2006; ERWIN et al., 2011; GILES et al., 2013). Isso se deve, em parte, às características morfológicas e anatômicas destes animais, como pouca produção de biomassa e altas taxas de fluxo de água do mar (TAYLOR et al., 2007). Portanto, estas características permitem uma maior

dispersão dos microrganismos para a água, sendo que foi sugerido que a principal fonte de alimento para essas esponjas pode ser a matéria orgânica dissolvida na água (WEIZ et al., 2008; SCHLÄPPY et al., 2010; FREEMAN; THACKER, 2011).

É interessante notar que ambos os tipos de esponjas (AAM e BAM) ocorrem no mesmo local (HENTSCHEL et al., 2006). Atualmente, dados de abundância de grupos bacterianos dentro dos tecidos de esponjas permanecem escassos, embora estudos recentes tenham empregado esforços em descrever a abundância de taxa bacterianos usando PCR quantitativo para um restrito grupo de esponjas (CASSLER et al., 2007; NOYER et al., 2010; MOITINHO-SILVA et al., 2014; BAYER et al., 2014a). Estes avanços têm permitido evidenciar diferenças relacionadas à abundância de taxa bacterianos dentro de cada hospedeiro.

A partir do conhecimento de que esponjas se associam a uma abundante comunidade microbiana, passou-se a estudar a especificidade dessas associações. Inicialmente, Wilkinson (1978) investigou a especificidade das associações para mais de 500 linhagens bacterianas cultivadas a partir de esponjas e água do mar. Esses isolados foram separados em seis grupos baseado em suas características morfológicas e metabólicas. Um desses grupos foi exclusivo de esponjas e foi caracterizado como simbiote, enquanto os outros cinco grupos continham uma mistura de simbiotes de esponjas e bactérias isoladas da água do mar.

Devido à grande maioria dos microrganismos presente no tecido de esponjas ainda não serem cultivados, a especificidade das associações bactérias-esponjas, vem sendo investigada com ferramentas moleculares baseadas no uso do gene 16S rRNA como marcador filogenético (WEBSTER et al., 2010; LEE et al., 2011; JACKSON et al., 2012; SIMISTER et al., 2012, TAYLOR et al., 2013; KENNEDY et al., 2014; HARDOIM; COSTA, 2014a). Assim, mais de 50 filos bacterianos, incluindo membros raros, abundantes e candidatos a filos, tais como Poribacteria e Tectomicrobia, foram identificados em esponjas marinhas (WEBSTER et al., 2010; SCHMITT et al., 2012; WEBSTER; TAYLOR, 2012; WILSON et al., 2014; REVEILLAUD et al., 2014; THOMAS et al., 2016).

As linhagens bacterianas frequentemente abundantes em esponjas incluem membros dos filos Proteobacteria, Chloroflexi, Actinobacteria, Acidobacteria, Firmicutes, Cyanobacteria e o candidato a filo Poribacteria (WEBSTER et al., 2001; HENTSCHEL et al., 2012, SCHMITT et al., 2012; WEBSTER; TAYLOR, 2012; REVEILLAUD et al., 2014; RUA et al., 2015; THOMAS et al., 2016). Entretanto, é

importante destacar que comunidades raras no ambiente marinho podem também rapidamente tornar-se abundantes ou desempenhar funções importantes para o ecossistema (LYNCH; NEUFELD, 2015; FUHRMAN et al., 2015). A Figura 2 ilustra os principais grupos detectados em exames da diversidade bacteriana de esponjas marinhas.

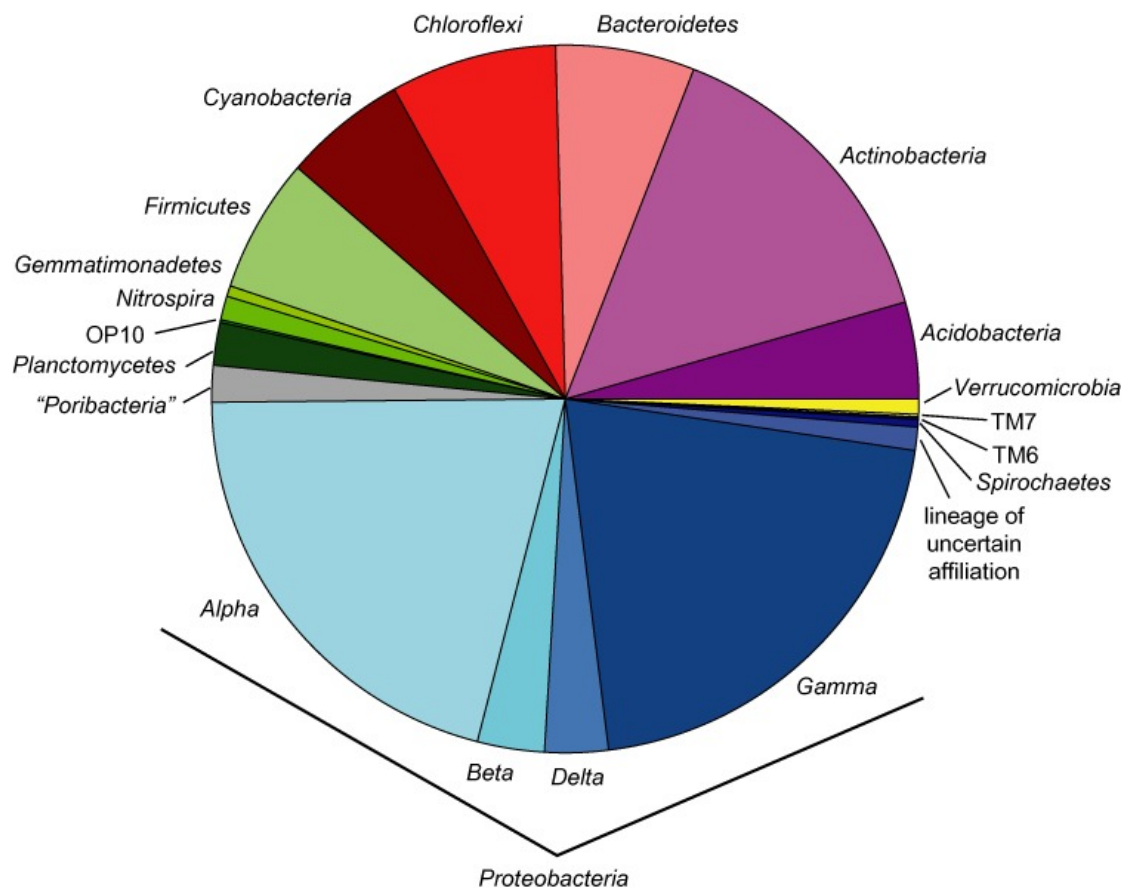


Figura 2 – Representação gráfica da diversidade de grupos bacterianos frequentemente detectados em associação com esponjas marinhas

Fonte: Modificado de Webster e Taylor (2012)

Baseado em análises filogenéticas de sequências do gene 16S rRNA, pesquisas têm trazido evidências de populações microbianas filogeneticamente complexas, mas uniformes, em diferentes oceanos (HENTSCHEL et al., 2002; MONTALVO;HILL, 2011; REVEILLAUD et al., 2014). Assim, notou-se um grupo de bactérias específico, formado por sequências do gene 16S rRNA detectados exclusivamente em esponjas (HENTSCHEL et al., 2002), compondo uma microbiota

especialista (LEE et al., 2011; SCHMITT et al., 2012; GLOECKNER et al., 2013a; GILES et al., 2013; WEBSTER et al., 2013).

Posteriormente, Erwin et al. (2012a) sugeriram que a comunidade bacteriana em esponjas é formada por uma mistura de UTOs (Unidades Taxonômicas Operacionais) específicas ao hospedeiro e também generalistas, encontradas em diversas outras esponjas, independentemente do local de amostragem. Vale ressaltar que agora se sabe que alguns desses microrganismos, ao invés de existirem exclusivamente em esponjas, ocorrem em baixos números em outros ambientes, compondo uma biosfera rara (SIMISTER et al., 2012; TAYLOR et al., 2013). Enquanto a verdadeira natureza esponja-específica é debatida, um estudo recente tem sugerido o termo “esponja-enriquecido” para se descrever comunidades abundantes em esponjas (MOITINHO-SILVA et al., 2014).

3.4 Processos de aquisição, transmissão e manutenção da comunidade bacteriana

Com o aumento de informações acerca da associação bactéria-esponja, novas hipóteses foram levantadas sobre a manutenção das comunidades bacterianas associadas ao hospedeiro; e como essas animais adquirem uma comunidade microbiana altamente complexa. Nesse sentido, Lévi e Porte (1962) observaram, por técnica microscópica, microrganismos em diferentes estágios reprodutivos de esponjas. Esta observação levou a assumir que parte da microbiota de esponjas é transferida verticalmente a partir dos parentais para a próxima geração, via células reprodutivas. Adicionalmente, estudos baseados em sequenciamento do gene 16S rRNA, confirmaram a transmissão de linhagens microbianas a partir de esponjas adultas para larvas (ERESKOVSKY et al., 2005; SHARP et al., 2007; SCHMITT et al., 2007, 2008; LEE et al., 2009; WEBSTER et al., 2010; GLOECKNER et al., 2013b). No entanto, ainda resta ser esclarecido o quão robusto é este processo de transmissão vertical; por exemplo, se estes simbiossomas também ocorrem no ambiente como uma biosfera rara e se estas populações transferidas persistem ou se alteram durante o desenvolvimento de estágios juvenis do hospedeiro.

Consequentemente, a observação de transferência vertical também levou a hipótese que eventos de co-evolução, e potencialmente co-especiação poderiam

ocorrer entre as esponjas hospedeiras e seus simbioses microbianos (ERPENBECK et al., 2002; RIDLEY et al., 2005; MONTALVO; HILL, 2011; THACKER; FREEMAN, 2012). Contudo, como ainda não se encontrou uma forte evidência para esse fenômeno (THACKER & STARNES, 2003; TAYLOR et al., 2013; EASSON & THACKER, 2014; REVEILLAUD et al., 2014), alguns autores sugerem que a aquisição de simbioses é aleatória, a partir de microrganismos da coluna d'água, por um processo de transmissão horizontal a partir do ambiente (SCHMITT et al., 2008; WEBSTER et al., 2010).

Pode-se ressaltar que cada uma destas estratégias (vertical e horizontal), tem benefícios e custos. Por exemplo, enquanto a transmissão vertical garante que a prole obtém seus simbioses a partir dos parentais, esta estratégia pode também resultar na redução do genoma do simbiote ou perdas de capacidades metabólicas para as próximas gerações (WEBSTER; THOMAS, 2016). Evidências recentes apoiam esta declaração, tendo sido observado que a interação simbiótica entre cianobactéria e o hospedeiro causou perdas de genes envolvidos em várias funções não essenciais (GAO et al., 2014; BURGS DORF et al., 2015). Além disso, a perda de simbioses devido a condições sub-ótimas de desenvolvimento do hospedeiro poderia impactar altamente a saúde do hospedeiro ou da prole. Ainda, a aquisição horizontal também tem seu próprio risco para a manutenção da comunidade microbiana, tais como a dependência da disponibilidade do simbiote no ambiente e a possível aquisição de patógenos (THACKER; FREEMAN, 2012).

Atualmente, há um consenso que ambas as forças, vertical e horizontal, atuam na manutenção da comunidade microbiana (TAYLOR et al., 2007; SIPKEMA et al., 2015), sendo que ainda é necessário ser investigado o equilíbrio entre estas duas estratégias de aquisição da microbiota (WEBSTER & THOMAS, 2016).

Em nível molecular, pouco é compreendido sobre a interação entre esponjas e microrganismos nos processos de aquisição e manutenção de simbioses a cada hospedeiro (HENTSCHEL et al., 2012). Investigações recentes têm sugerido potenciais mecanismos de interação bactéria-esponja, incluindo proteínas dos simbioses que contêm domínios encontrados em células eucarióticas. Dessa forma, acredita-se que estes domínios semelhantes a proteínas eucarióticas poderiam mediar interações proteína-proteína para promover o estabelecimento do estilo de vida dentro da matriz extracelular (NGUYEN et al., 2014). Outro potencial mecanismo de interação bactéria-esponja inclui estratégias de *quorum sensing*, os

quais permitem que bactérias percebam sinais da densidade populacional através de moléculas sinalizadoras, como N-acil homoserina lactona e pequenos peptídeos da classe das dicetopiperazinas (TAYLOR et al., 2004; MOHAMED et al., 2008; GU et al., 2013).

Por outro lado, também acredita-se que o sistema imune do hospedeiro pode contribuir para as interações com bactérias. Esta hipótese passou a ser investigada com a disponibilidade de sequências do genoma completo da esponja *Amphimedon queenslandica*, cujo estudo tem sugerido diversos mecanismos de transdução de sinais que poderiam possibilitar a aquisição de uma comunidade altamente complexa (GAUTHIER et al., 2010; ELINAV et al., 2011).

Uma questão bastante investigada no campo da microbiologia de esponjas diz respeito à estabilidade da associação bactéria-esponja, mas um completo entendimento ainda não foi alcançado. Diversos estudos demonstram estabilidade da microbiota cruzando escalas temporal e/ou espacial, ou sob distintas condições ambientais (temperatura, profundidade, intensidade de luz, etc.) (THIEL et al., 2007; ERWIN et al., 2012b; PITA et al., 2013a, 2013b; SIMISTER et al., 2013; CÁRDENAS et al., 2014; HARDOIM; COSTA, 2014a). Porém, há outros trabalhos em que foram observadas mudanças no perfil da comunidade microbiana sob diferentes condições ambientais (TURQUE et al., 2010; WHITE et al., 2012; MORROW et al., 2015). Logo, estes dados contrastantes indicam que possivelmente as forças que regem sobre a estabilidade da microbiota associada a esponjas devem variar de acordo com a identidade do hospedeiro.

Também permanece a ser esclarecido como espécies de esponjas filogeneticamente distintas e isoladas geograficamente compartilham microrganismos que estão aparentemente ausentes no ambiente circundante (WEBSTER; THOMAS, 2016). Deve-se salientar, como anteriormente mencionado, que simbioses de esponjas podem de fato existir em baixa abundância na água do mar, e assim o ambiente agiria como provedor (TAYLOR et al., 2013). Além do mais, acredita-se que algumas bactérias que são detectadas em esponjas devem estar presentes como parte da dieta da esponja ou por um resultado de enriquecimento temporal e, portanto, não fazendo parte de uma microbiota estável (TAYLOR et al., 2007; SPIKEMA et al., 2015).

3.5 Relação entre a filogenia do hospedeiro e comunidades microbianas

Considerando que a proximidade filogenética de hospedeiros eucarióticos pode implicar em maior número de caracteres anatômicos e fisiológicos semelhantes, espera-se que a microbiota de indivíduos filogeneticamente próximos seja similar, como apoiado por diversos trabalhos (MANZ et al., 2000; LEY et al., 2008; OCHMAN et al., 2010; MONTALVO; HILL, 2011; BOUFFAUD et al., 2012, 2014; BJÖRK et al., 2013; SCHÖTTNER et al., 2013). No entanto, trata-se de uma questão ainda sem consenso no estudo da microbiologia de esponjas, uma vez que muitos autores não observaram uma clara relação entre a filogenia do hospedeiro e suas comunidades associadas (SCHMITT et al., 2012; HARDOIM et al., 2012; WEBSTER et al., 2013).

No trabalho desenvolvido por Schmitt et al. (2012), foi utilizado a técnica de pirosequenciamento para investigar a composição bacteriana em 32 espécies de esponjas de diferentes oceanos. Os autores verificaram que esponjas compartilham maior similaridade bacteriana entre si, do que com a água do mar, e foi observado que a microbiota habitando esponjas filogeneticamente mais próximas se agruparam de acordo com o local de coleta (ambiente temperado vs. tropical).

Para limitar os possíveis efeitos de ambientes contrastantes no perfil da comunidade bacteriana, Hardoim et al. (2012) investigaram, utilizando a técnica de DGGE (do inglês, *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), a composição microbiana em duas espécies de esponjas filogeneticamente próximas, que foram amostradas em estrita proximidade espacial. Os resultados deste estudo apontaram para uma comunidade bacteriana altamente divergente entre as espécies analisadas, concluindo que cada hospedeiro recruta uma comunidade bacteriana específica.

Em concordância, outros autores também indicaram que a identidade do hospedeiro é o principal fator que molda a comunidade de simbioses de esponjas (ERWIN et al., 2012b; PITA et al., 2013a, 2013b; REVEILLAUD et al., 2014; CUVÉLIER et al., 2014). Estes estudos sugerem que questões específicas relacionadas aos hospedeiros desempenham papéis importantes em estruturar e manter as relações entre bactérias e seus simbioses, enquanto fatores ambientais e biogeográficos exercem apenas menor efeito.

No entanto, em muitos destes estudos (ERWIN et al., 2012; HARDOIM et al., 2012b; PITA et al., 2013a, 2013b; CUVELIER et al., 2014), pode ter faltado a inclusão de algum táxon de esponja mais distantemente relacionada aos demais para indicar com mais segurança se as diferenças nas composições microbianas de hospedeiros filogeneticamente próximos são quantitativamente menores quando comparado com um apropriado táxon irmão.

Em contraste com os estudos citados acima, a importância da filogenia da esponja na estruturação da comunidade bacteriana foi demonstrada por Schöttner et al. (2013), quando encontraram uma significativa relação positiva entre as distâncias filogenéticas de esponjas da família Geodiidae e a dissimilaridade da comunidade bacteriana, implicando que espécies Geodiidae mais filogeneticamente próximas abrigam mais similar comunidades bacterianas. Resultado similar foi encontrado por Montalvo e Hill (2011), quando utilizaram bibliotecas de clones do gene 16S rRNA para examinar as comunidades bacterianas que habitam duas espécies do gênero *Xestospongia* vivendo em diferentes oceanos.

Easson e Thacker (2014) observaram que apesar da estrita diferença na composição microbiana de esponjas filogeneticamente próximas, o índice de diversidade Simpson inverso, um aspecto da estrutura da comunidade, exibiu significativo sinal filogenético cruzando a filogenia do hospedeiro. Isto implica que embora a identidade de UTOs variem substancialmente, espécies filogeneticamente relacionadas tendem a abrigar comunidades microbianas com padrões mais similares de abundância relativa e dominância. Estes resultados suportaram a conclusão que a diversidade microbiana dentro de uma esponja hospedeira parece ser fortemente influenciada pela filogenia do hospedeiro.

Recentemente, uma iniciativa global foi realizada para investigar a estrutura e composição microbiana que habita 81 espécies de esponjas, compreendendo a maior diversidade de hospedeiros já analisados (THOMAS et al., 2016). Os dados gerados neste estudo possibilitaram examinar em profundidade o impacto da história evolutiva do hospedeiro na estrutura e composição de suas comunidades simbióticas. As descobertas indicaram que a história evolutiva dos hospedeiros impacta principalmente a complexidade uma vez que a composição da comunidade microbiana.

Em geral, devido haver à existência de tantos trabalhos contrastantes neste tópico de pesquisa, ainda é necessária uma investigação detalhada das

comunidades microbianas associadas a esponjas, com foco principal em descrever os fatores ecológicos e evolutivos que determinam a estrutura e dinâmica dessas comunidades.

3.6 Papeis funcionais que bactérias desempenham na esponja hospedeira

Como revisado por Taylor et al. (2007), microrganismos associados a esponjas são capazes de realizar fotossíntese, oxidação de metano, nitrificação, fixação de nitrogênio, redução de sulfato, entre outras funções. Ainda, especula-se que bactérias possam atuar na digestão intracelular, translocação de metabólitos, estabilização do esqueleto e defesa química contra predadores e patógenos (TAYLOR et al., 2007; WEBSTER; TAYLOR, 2012). Nesta revisão é destacado o atual conhecimento das potenciais funções fisiológicas que os microrganismos desempenham no hospedeiro esponja, dentro dos ciclos do carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre. Metabólitos secundários que podem estar relacionado a defesa química da esponja hospedeira é discutido na próxima seção.

Carbono: No que diz respeito ao metabolismo de carbono, muitas espécies de esponjas tropicais abrigam densas populações de cianobactérias fotossintéticas, e a translocação de produtos da fotossíntese do simbiote para o hospedeiro foi demonstrada em várias espécies de esponjas (TAYLOR et al., 2007). Em algumas esponjas, mais de 50% das suas necessidades energéticas são obtidas a partir de cianobactérias simbióticas (WILKINSON, 1983).

Nitrogênio: Em águas oligotróficas onde os recursos de nitrogênio são baixos, microrganismos simbióticos podem contribuir para ciclagem de nitrogênio (N_2), via fixação de N_2 atmosférico (WEBSTER; THOMAS, 2016). Esta função é realizada principalmente por diferentes linhagens de cianobactérias, embora outras bactérias heterotróficas apresentam potencial para a fixação de N_2 (TAYLOR et al., 2007). Atualmente, marcações utilizando isótopos estáveis têm sido empregadas para investigar a contribuição de carbono e nitrogênio derivados de bactérias para a esponja hospedeira (WEISZ et al., 2007; FREEMAN et al., 2011, 2013, 2015). Em geral, estes estudos demonstraram que a transferência de nutrientes do simbiote para o hospedeiro difere substancialmente entre as espécies de esponjas.

Nitrificação em esponjas tem recebido uma crescente atenção de pesquisa. Investigações da diversidade e função da microbiota que habita esponjas têm

revelado a presença de microrganismos nitrificantes, tais como membros dos gêneros *Nitrospira* e *Nitrosomonas* (RADAX et al., 2012a; REVEILLAUD et al., 2014). Ao mesmo tempo, a oxidação de amônia mediada por microrganismos amônia-oxidantes (Archaeae e Bacteria) tem sido bastante investigada no holobionte esponja (BAYER et al., 2008; HOFFMANN et al., 2009; TURQUE et al., 2010; FAN et al., 2012; RADAX et al., 2012a, 2012b). A amônia, a qual pode ser tóxico a eucariotos, é um resíduo gerado pelo metabolismo de muitos animais marinhos e, embora seja altamente solúvel em água, a amônia pode acumular dentro dos tecidos das esponjas (TAYLOR et al., 2007). Logo, microrganismos que oxidam amônia podem ser cruciais para manutenção da vida de invertebrados marinhos. Adicionalmente, condições limitadas de difusão de oxigênio dentro dos tecidos de esponjas tem favorecido a oxidação de amônia por via anaeróbica (TAYLOR et al., 2007; MALDONADO et al., 2012).

Genes envolvidos em etapas de desnitrificação foram também detectados no holobionte esponja (FAN et al., 2012; LIU et al., 2012), assim como genes que codificam para transportadores de ureia e também para a enzima urease (SIEGL et al., 2011; SU et al., 2013; WEBSTER; THOMAS, 2016). A ureia é um dos compostos nitrogenados mais abundantes em recifes de corais e provavelmente serve como uma fonte de nitrogênio alternativa para o holobionte esponja.

Fósforo: O fósforo é um nutriente essencial a vida e encontrado em baixas concentrações em ecossistemas recifais. Embora a fauna marinha nestes ambientes seja altamente abundante, pouco é compreendido sobre a ciclagem de fósforo em sistemas recifais. Recentemente, Zhang et al. (2015) apresentaram fortes evidências para produção e armazenamento de grânulos de polifosfato por simbioses de esponjas. Esta descoberta tem maiores implicações para o nosso entendimento, uma vez que nas três espécies de esponjas examinadas, os grânulos de polifosfato contribuíram com cerca de 25 a 40% do total de fósforo no tecido das esponjas. Colman (2015) propõe que estes grânulos de polifosfato, pode, na verdade, representar um suprimento prontamente disponível de energia para o holobionte durante privações de fósforo. Caso esta hipótese seja validada, seria um dos primeiros exemplos de simbioses de esponja armazenando nutrientes e energia para o seu hospedeiro, ou até mesmo, para outros organismos do ecossistema de recifes.

Enxofre: Ambos microrganismos capazes de reduzir e oxidar enxofre habitam esponjas, com as bactérias oxidantes de enxofre (BOE) pensadas para oxidar os compostos reduzidos de enxofre gerados por bactérias redutoras de sulfato (BRS). Frequentemente BOE tais como aquelas pertencentes as famílias Rhodospirillaceae e Chromatiaceae são detectadas em exames da diversidade microbiana de esponjas (SCHIMTT et al., 2012; HARDOIM et al., 2012; THOMAS et al., 2016). Similarmente, as BRS pertencentes ao gênero *Desulfoarculus*, *Desulfomonile* e *Syntrophus* foram detectadas no microbioma da esponja *Geodia barretti* (HOFFMANN et al., 2006).

Para entender o papel do metabolismo de enxofre dentro do holobionte esponja, Hoffmann et al. (2005) utilizaram técnicas de marcações isotópicas e encontraram taxas elevadas de redução de sulfato, as quais segundo Taylor et al. (2007) não foram ainda relatadas em qualquer outro sistema natural. Interessantemente, no estudo realizado por Hoffmann et al. (2005) análises de lipídeos biomarcados indicaram que ácidos carboxílicos derivados de BRS foram transferidos para a esponja hospedeira, e as atividades de BOE combinados com processos químicos de reoxidação foram pensados para prevenir o acúmulo tóxico de sulfeto. Ainda, como sugerido por Taylor et al. (2007) é possível que BOE possibilite as esponjas a ocuparem ambientes ricos em sulfetos.

Recentemente, o primeiro genoma de uma BOE associada a esponja revelou uma capacidade altamente versátil para a absorção de carboidratos, bem como genes relacionados ao metabolismo autotrófico e heterotrófico que pode ajudar a manter a associação com hospedeiro mesmo sob privações de compostos reduzidos de enxofre (TIAN et al., 2014). Adicionalmente, diversos microrganismos isolados de esponjas tiveram seus genomas sequenciados e certamente a análise profunda destes dados, combinado a avaliações experimentais, possibilitará maior compreensão dos possíveis papéis que estes microrganismos desempenham no seu hospedeiro. Enfim, ainda há uma grande lacuna a ser preenchida nas pesquisas no que dizem respeito as funções que os microrganismos exercem nas suas esponjas hospedeiras.

3.7 Cultivo de bactérias marinhas e potencial de compostos bioativos para agrobiotecnologia

Desde que as esponjas são organismos sésseis e desprovidos de eficientes defesas físicas; acredita-se que durante a evolução estes animais passaram a produzir diversos compostos bioativos que devem agir como potentes “armas químicas” contra competidores e predadores (TAYLOR et al., 2007). Esta declaração é apoiada pelo fato das esponjas abrigarem específicas e abundantes comunidades microbianas, as quais podem ser responsáveis pela grande diversidade química frequentemente encontrada nestes animais. Ainda, devido as peculiaridades do ambiente marinho, estes animais podem servir como modelo para busca de bactérias marinhas com propriedades químicas únicas (BERLINCK et al., 2004; PIEL et al., 2004; HENTSCHEL et al., 2006).

No ambiente marinho já foi descrito mais do que 15 mil produtos naturais, sendo que mais de 5.300 diferentes substâncias foram descritas a partir do holobionte esponja, e estima-se que mais de 200 novos metabólitos são descritos a cada ano (LAPORT et al., 2009).

Dados atuais revelam que a taxa de sucesso de descoberta de drogas a partir do ambiente marinho é de 1 novo composto a cada 3.140 classes químicas conhecidas, a qual é duas a três vezes melhor do que a média da indústria (1 composto a cada 5.000-10.000 testados) (GERWICK; MOORE, 2012). Em particular, comparado a outras associações que ocorrem no ambiente terrestre, a pequena fração de microrganismos marinhos que já foram cultivados de esponjas, em relação a sua enorme diversidade estimada, tem revelado que o holobionte esponja é uma verdadeira “mina de ouro” para busca de metabólitos secundários únicos com novos esqueletos de carbono, e mais importante, novas bioatividades (GIDDINGS; NEWMAN, 2015; SILVA, 2015).

Até o momento, há sete drogas derivadas do ambiente marinho que foram aprovadas pelo órgão regulador FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*), cinco das quais foram descobertas a partir de interações mutualísticas entre microrganismos e invertebrados marinhos (GIDDINGS; NEWMAN, 2015). Diversos outros candidatos a drogas estão em fase de triagem pré-clínica ou em estágios avançados de triagem clínica (NEWMAN; CRAGG, 2014).

As buscas por produtos naturais em diferentes esponjas marinhas têm revelado a ocorrência de substâncias estruturalmente similar, senão iguais, aquelas produzidas por microrganismos conhecidos (PIEL et al., 2004; WATERS et al., 2014; WILSON et al., 2014). Isto reforça a tese de que muitos dos compostos bioativos encontrados em invertebrados marinhos sejam na verdade produzidos pela microbiota associada. Desde então, diversos esforços de pesquisa têm sido realizados para cultivar e explorar o potencial biotecnológico de microrganismos associados a esponjas.

No entanto, tal como para outros ambientes, somente uma pequena fração do consórcio microbiano que habita esponjas foram cultivados (TAYLOR et al., 2007). Recente estudo mostrou que procedimentos de cultivo padrão têm levado a isolar microrganismos que são encontrados em distintas espécies de esponjas (HARDOIM et al., 2014). Muitos destes membros cultivados são representantes dos filos Firmicutes (*Bacillus*) e Proteobacteria (Alpha e Gammaproteobacteria), os quais em geral, são membros abundantes da comunidade de esponjas (HARDOIM et al., 2014; ESTEVES et al., 2016).

Em contraste, diversas abordagens de cultivo inovadoras vem sendo empregadas, para possibilitar o isolamento de membros abundantes, raros ou até mesmo de grupos bacterianos específicos (Actinobacteria e Planctomycetes) (OLSON et al., 2000; PIMENTEL-ELARDO et al., 2003; SIPKEMA et al., 2011; LAVY et al., 2014; JUNG et al., 2014; STEINERT et al., 2014; ESTEVES et al., 2016; SILVA, 2015). Estas abordagens têm aumentado a diversidade de bactérias cultivadas, sendo que em alguns casos, este aumento correspondeu a mais de 14% (SIPKEMA et al., 2011). Entretanto, permanece um desafio cultivar microrganismos que são simbiontes obrigatórios de esponjas (MONTALVO et al., 2014; HARDOIM et al., 2014; ESTEVES et al., 2016).

O cultivo de bactérias marinhas vem acompanhado da crescente descoberta de novas vias metabólicas e produtos naturais biologicamente ativos. Há um grande interesse biomédico por produtos naturais de microrganismos associados a esponjas, uma vez que estes, tem mostrado atividades anticâncer, antibacteriana, antifúngica, antiviral, anti-protozoário, anti-helmíntico, anti-inflamatória, imunossupressora, neurosupressora e anti-incrustantes (BERLINCK et al., 2004; LAPORT et al., 2009). Por outro lado, pouco esforço tem sido dedicado à pesquisa para descoberta de compostos agroquímicos a partir de produtos naturais marinhos,

especialmente quando comparado à busca por compostos farmacêuticos (EL SAYED et al., 1997; PENG et al., 2003; VAN PÉE; PATALLO, 2006; WANG, 2006; CHELLARAM et al., 2012; ANAND et al., 2012a, 2012b; DHANASEKARAN et al., 2012; CHELLARAM; JOHN, 2015a, 2015b; SILVA, 2015).

No estudo realizado por Peng et al. (2003) foram testados produtos naturais previamente isolados de esponjas marinhas contra modelos agrícolas (fungos, insetos e plantas) que são frequentemente usados como estratégias para a busca de novos agroquímicos. Os resultados revelaram que as substâncias químicas isoladas apresentaram potentes bioatividades frente a todos os modelos utilizados. Adicionalmente, Van Pée e Patallo (2006) reportaram a busca por novas enzimas halogenases que apresentam potencial para produção de herbicidas e pesticidas. Muitas esponjas marinhas contêm grandes quantidades de compostos orgânicos halogenados e são, portanto, fontes potenciais para enzimas halogenadoras e dehalogenadoras (AHN et al., 2003; GROZDANOV; HENTSCHEL, 2007; KENNEDY et al., 2008; BAYER et al., 2013).

Uma vez que uma grande diversidade de classes químicas com propriedades bioativas são encontradas exclusivamente no ambiente marinho, acredita-se que essas substâncias podem servir como protótipos para o desenvolvimento de novos agentes agroquímicos (PENG et al., 2003; VAN PÉE; PATALLO, 2006). Caso esta hipótese seja confirmada, certamente haverá uma revolução na indústria de agroquímicos, uma vez que existe a necessidade de novas alternativas, ambientalmente seguras e eficazes, aos pesticidas sintéticos.

Novos registros de patentes com foco em biopesticidas são realizados nos Estados Unidos a cada ano, sendo que a maioria destas solicitações são de microrganismos de ambiente terrestre (CANTRELL et al., 2012). Contudo, para o nosso conhecimento biomoléculas derivadas do ambiente marinho, mais especificamente nereistoxin e seus análogos – thiocyclam, bensultap e cartap, tem sido comercializadas como agroquímicos que possuem atividade inseticida (FEDDER, 2013).

No ano de 2015, mesmo durante recessão da economia brasileira, foram vendidos mais de 9,5 bilhões de dólares em agroquímicos, sendo que já foi relatado pelo Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal (SINDIVEG, 2015) vendas superiores a 12 bilhões de dólares no ano de 2014. Ainda, estima-se um aumento de 6% ao ano para o mercado de defensivos agrícolas. No mercado de

herbicidas, dois produtos se destacam, glifosato e paraquat, os quais são altamente tóxicos a humanos e ao meio ambiente (MEYER et al., 2003). Além do mais, há relatos de plantas que se tornaram resistentes a estes compostos. Tendo em vista os vários problemas, a venda destes agroquímicos sintéticos devem cair em uma contínua desaceleração, ao passo que novas moléculas sejam descobertas para atender as necessidades do setor agrícola.

Recentemente, nosso grupo de pesquisa tem concentrado esforços em isolar bactérias associadas à esponjas marinhas como fonte de novos agroquímicos (SILVA, 2015). Um novo isolado *Streptomyces* sp. ASPSP 103, apresentou ação algicida e potente atividade herbicida. O composto bioativo analisado correspondeu à classe butenolida identificado como 4-hidroxi-10-metil-11-oxo-dodec-2-en-1,4-olide ($C_{13}H_{20}O_3$). Apesar de ser um composto já conhecido na literatura e retirado de *Streptomyces* spp. associados à esponjas (SCHWARTZ, 2014), o trabalho desenvolvido por Silva (2015) foi o primeiro relato do uso de butenolida para a atividade herbicida de pré-emergência em modelo de monocotiledônea.

Apesar do avanço no cultivo de bactérias marinhas, tem sido sugerido que o desenvolvimento de produtos biotecnológicos a partir de microrganismos associados à esponjas podem, em um futuro próximo, tomar novas direções com o uso de ferramentas metagenômicas (KENNEDY et al., 2008). Técnicas de metagenômica podem ser utilizadas para acessar o grande potencial genético de microrganismos associados à esponjas, especialmente de fontes ainda não cultivadas, tais como os candidatos a filo Tectomicrobia e Poribacteria (WILSON et al., 2014; FREEMAN et al., 2016). Sobretudo, abordagens de expressão heteróloga têm também levado ao isolamento de vias metabólicas para a exploração sustentável da diversidade química presente no holobionte esponja (PIEL et al., 2004).

Em particular, muitos esforços vêm sendo empregados na descoberta de vias metabólicas envolvendo inicialmente, a detecção de genes que codificam para as enzimas multifuncionais conhecidas como poliketídeos sintase (PKS) e peptídeos sintase não-ribossômicos (NRPS) (PIEL et al., 2004; FIESELER et al., 2007; DELLA SALA et al., 2013). Esses genes são de fato ausentes em metazoários, sugerindo uma origem microbiana, e são particularmente um ótimo objeto de estudo para investigar o papel dos simbioses na química das esponjas.

Dessa forma, estudos demonstram que é necessário integrar abordagens de cultivo com estratégias de metagenômica, para se obter uma visão global da

diversidade e do potencial metabólico do consórcio microbiano em esponjas (HARDOIM et al., 2014; ESTEVES et al., 2016), assim como utilizar abordagens multidisciplinares envolvendo análises químicas em grande profundidade (NMR, HPLC e LC-MS), para se alcançar resultados satisfatórios (SILVA, 2015).

Baseado no sucesso de interações bactérias-esponja como maior fonte de novas drogas, este trabalho também explora o consórcio bacteriano presente em esponjas para suprir crescentes necessidades da agrobiotecnologia.

Referências.

AHN, Y.B.; RHEE, S.K.; FENNELL, D.E.; KERKHOF, L.J.; HENTSCHEL, U.; HÄGGBLUM, M.M. Reductive dehalogenation of brominated phenolic compounds by microorganisms associated with the marine sponge *Aplysina aerophoba*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 7, p. 4159-4166, 2003.

ANAND, T.P.; CHELLARAM, C.; SHANTHINI, F.C. Herbicidal and Growth promoter activity of marine bacteria. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, Guntur, v. 3, p. 359-368, 2012a.

ANAND, T.P.; SHANTHINI, F.C.; CHELLARAM, C. Screening for herbicidal and growth promotor activities in marine bacteria. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, Guntur, v. 3, n. 2, p. 659-668, 2012b.

AYLING, A.L. Patterns of sexuality, asexual reproduction and recruitment in some subtidal marine Demospongiae. **The Biological Bulletin**, Lancaster, v. 158, n. 3, p. 271-282, 1980.

BAYER, K.; KAMKE, J.; HENTSCHEL, U. Quantification of bacterial and archaeal symbionts in high and low microbial abundance sponges using real-time PCR. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 89, n. 3, p. 679-690, 2014b.

BAYER, K.; SCHMITT, S.; HENTSCHEL, U. Physiology, phylogeny and in situ evidence for bacterial and archaeal nitrifiers in the marine sponge *Aplysina aerophoba*. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 10, n. 11, p. 2942-2955, 2008.

BAYER, K.; SCHEUERMAYER, M.; FIESELER, L.; HENTSCHEL, U. Genomic mining for novel FADH₂-dependent halogenases in marine sponge-associated microbial consortia. **Marine biotechnology**, New York, v. 15, n. 1, p. 63-72, 2013.

BAYER, K.; MOITINHO-SILVA, L.; BRÜMMER, F.; CANNISTRACI, C.V.; RAVASI, T.; HENTSCHEL, U. GeoChip-based insights into the microbial functional gene repertoire of marine sponges (high microbial abundance, low microbial abundance) and seawater. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 90, n. 3, p. 832-843, 2014a.

BERLINCK, R.G.; HAJDU, E.; DA ROCHA, R.M.; DE OLIVEIRA, J.H.; HERNÁNDEZ, I.L.; SELEGHIM, M.H.; GRANATO, A.C.; ALMEIDA, E.V.R.; NUÑEZ, C.V.; MURICY,

G.; PEIXINHO, S.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; CAVALCANTI, B.C.; NASCIMENTO, G.G.F.; THIEMANN, O.; SILVA, M.; SOUZA, A.O.; SILVA, C.L.; MINARINI, P.R.R. Challenges and rewards of research in marine natural products chemistry in Brazil. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 67, n. 3, p. 510-522, 2004.

BJÖRK, J.R.; DÍEZ-VIVES, C.; COMA, R.; RIBES, M.; MONTROYA, J.M. Specificity and temporal dynamics of complex bacteria–sponge symbiotic interactions. **Ecology**, Washington, v. 94, n. 12, p. 2781-2791, 2013.

BOUFFAUD, M.L.; POIRIER, M.A.; MULLER, D.; MOËNNE-LOCCOZ, Y. Root microbiome relates to plant host evolution in maize and other Poaceae. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 16, n. 9, p. 2804-2814, 2014.

BOUFFAUD, M.L.; KYSELKOVÁ, M.; GOUESNARD, B.; GRUNDMANN, G.; MULLER, D.; MOËNNE-LOCCOZ, Y. Is diversification history of maize influencing selection of soil bacteria by roots? **Molecular Ecology**, Oxford, v. 21, n. 1, p. 195-206, 2012.

BRUSCA, R.C.; BRUSCA, G.J. Phylum Porifera: the sponges. In: SINAUER, A.D. (Ed.). **Invertebrates**. 2nd ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2002. p. 179–208.

BURGS DORF, I.; SLABY, B.M.; HANDLEY, K.M.; HABER, M.; BLOM, J.; MARSHALL, C.W.; GILBERT, J.A.; HENTSCHEL, U.; STEINDLER, L. Lifestyle evolution in cyanobacterial symbionts of sponges. **mBio**, Washington, v. 6, n. 3, p. e00391-15, 2015.

CANTRELL, C.L.; DAYAN, F.E.; DUKE, S. O. Natural products as sources for new pesticides. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 75, n. 6, p. 1231-1242, 2012.

CÁRDENAS, C.A.; BELL, J.J.; DAVY, S.K.; HOGGARD, M.; TAYLOR, M.W. Influence of environmental variation on symbiotic bacterial communities of two temperate sponges. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 88, n. 3, p. 516-527, 2014.

CÁRDENAS, P.; XAVIER, J.R.; REVEILLAUD, J.; SCHANDER, C.; RAPP, H.T. Molecular phylogeny of the Astrophorida (Porifera, Demospongiae) reveals an unexpected high level of spicule homoplasy. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 4, p. e18318, 2011.

CASSLER, M.; PETERSON, C.L.; LEDGER, A.; POMPONI, S.A.; WRIGHT, A.E.; WINEGAR, R.; MCCARTHY, P.J.; LOPEZ, J.V. Use of real-time qPCR to quantify members of the unculturable heterotrophic bacterial community in a deep sea marine sponge, *Vetulina* sp. **Microbial Ecology**, New York, v. 55, n. 3, p. 384-394, 2007.

CHELLARAM, C.; JOHN, A. Herbicidal activity of an epibiotic *Bacillus* strain WP3 from Sea Fan Coral. **Journal of Fisheries and Aquatic Science**, Faisalabad, v. 10, n. 2, p. 121, 2015a.

_____. Insecticidal activity of an epibiotic *Bacillus kochii* from Gorgonian Coral, *Junceella juncea* (Pallas, 1766). **Journal of Pure and Applied Microbiology**, Bhopal, v. 9, n. 3, p. 2459-2464, 2015b.

CHELLARAM, C.; ANAND, T.P.; SHAILAJA, N.R.; KESAVAN, D. Herbicidal effects of marine animal, *Trochus tentorium* from gulf of Mannar, Southeastern India. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, Faisalabad, v. 7, n. 3, p. 250-255, 2012.

COLMAN, A.S. Sponge symbionts and the marine P cycle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 112, n. 14, p. 4191-4192, 2015.

CROUÉ, J.; WEST, N.J.; ESCANDE, M.L.; INTERTAGLIA, L.; LEBARON, P.; SUZUKI, M.T. A single betaproteobacterium dominates the microbial community of the crambescidine-containing sponge *Crambe crambe*. **Scientific Reports**, London, v. 3, n. 2583, p. 1-8, 2013.

CUVELIER, M.L.; BLAKE, E.; MULHERON, R.; MCCARTHY, P.J.; BLACKWELDER, P.; THURBER, R.L.V.; LOPEZ, J.V. Two distinct microbial communities revealed in the sponge *Cinachyrella*. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 5, n. 581, p. 1-12, 2014.

DELLA SALA, G.; HOCHMUTH, T.; COSTANTINO, V.; TETA, R.; GERWICK, W.; GERWICK, L.; PIEL, J.; MANGONI, A. Polyketide genes in the marine sponge *Plakortis simplex*: a new group of mono modular type I polyketide synthases from sponge symbionts. **Environmental Microbiology Reports**, Hoboken, v. 5, n. 6, p. 809-818, 2013.

DHANASEKARAN, D., PANNEERSELVAM, A., THAJUDDIN, N. Applications of actinobacterial fungicides in agriculture and medicine. **INTECH**, Open Access, 2012. Disponível em: <<http://cdn.intechweb.org/pdfs/26022.pdf>> Acesso em: 06/06/2016.

DOSSE, G. Bakterien-und Pilzbefunde sowie pathologische und Fäulnisvorgänge in Meeres-und Süßwasserschwämmen. **Parasitology Research**, Berlin, v. 11, n. 2, p. 331-356, 1939.

EASSON, C.G.; THACKER, R.W. Phylogenetic signal in the community structure of host-specific microbiomes of tropical marine sponges. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 5, n. 532, p. 1-11, 2014.

EL SAYED, K.A.; DUNBAR, D.C.; PERRY, T.L.; WILKINS, S.P.; HAMANN, M.T.; GREENPLATE, J.T.; WIDEMAN, M.A. Marine natural products as prototype insecticidal agents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 45, n. 7, p. 2735-2739, 1997.

ELINAV, E.; STROWIG, T.; HENAO-MEJIA, J.; FLAVELL, R.A. Regulation of the antimicrobial response by NLR proteins. **Immunity**, Cambridge, v. 34, n. 5, p. 665-679, 2011.

ERESKOVSKY, A.V. **The comparative embryology of sponges**. New York: Springer, 2010, v. 1, 327 p.

ERESKOVSKY, A.V.; GONOBABLEVA, E.; VISHNYAKOV, A. Morphological evidence for vertical transmission of symbiotic bacteria in the viviparous sponge *Halisarca dujardini* Johnston (Porifera, Demospongiae, Halisarcida). **Marine Biology**, Berlin, v. 146, n. 5, p. 869-875, 2005.

ERPENBECK, D.; BREEUWER, J.; VAN DER VELDE, H.; VAN SOEST, R. Unravelling host and symbiont phylogenies of halichondrid sponges (Demospongiae, Porifera) using a mitochondrial marker. **Marine Biology**, Berlin, v. 141, n. 2, p. 377-386, 2002.

ERPENBECK, D.; WEIER, T.; DE VOOGD, N.J.; WÖRHEIDE, G.; SUTCLIFFE, P.; TODD, J.A.; MICHEL, E. Insights into the evolution of freshwater sponges (Porifera: Demospongiae: Spongillina): barcoding and phylogenetic data from Lake Tanganyika endemics indicate multiple invasions and unsettle existing taxonomy. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 61, n. 1, p. 231-236, 2011.

ERWIN, P.M.; OLSON, J.B.; THACKER, R.W. Phylogenetic diversity, host-specificity and community profiling of sponge-associated bacteria in the Northern Gulf of Mexico. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 11, p e26806, 2011.

ERWIN, P.M.; LÓPEZ-LEGENTIL, S.; GONZÁLEZ-PECH, R.; TURON, X. A specific mix of generalists: bacterial symbionts in Mediterranean *Ircinia* spp. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 79, n. 3, p. 619-637, 2012a.

ERWIN, P.M.; PITA, L.; LÓPEZ-LEGENTIL, S.; TURON, X. Stability of sponge-associated bacteria over large seasonal shifts in temperature and irradiance. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 78, n. 20, p. 7358-7368, 2012b.

ESTEVEZ, A.I.S.; AMER, N.; NGUYEN, M.; THOMAS, T. Sample processing impacts the viability and cultivability of the sponge microbiome. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 7, n. 499, p. 1-17, 2016.

FAN, L.; REYNOLDS, D.; LIU, M.; STARK, M.; KJELLEBERG, S.; WEBSTER, N.S.; THOMAS, T. Functional equivalence and evolutionary convergence in complex communities of microbial sponge symbionts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 109, n. 27, p. 1878-1887, 2012.

FEDDER, B. **Marine genetic resources, access and benefit sharing: legal and biological perspectives**. Abingdon: Routledge, 2013. 232 p.

FIESELER, L.; HENTSCHEL, U.; GROZDANOV, L.; SCHIRMER, A.; WEN, G.; PLATZER, M.; HRVATIN, S.; BUTZKE, D.; ZIMMERMANN, K.; PIEL, J. Widespread occurrence and genomic context of unusually small polyketide synthase genes in microbial consortia associated with marine sponges. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 7, p. 2144-2155, 2007.

FREEMAN, C.J.; THACKER, R.W. Complex interactions between marine sponges and their symbiotic microbial communities. **Limnology and Oceanography**, Waco, v. 56, n. 5, p. 1577-1586, 2011.

FREEMAN, C.J.; BAKER, D.M.; EASSON, C.G.; THACKER, R.W. Shifts in sponge-microbe mutualisms across an experimental irradiance gradient. **Marine Ecology Progress Series**, Oldendorf/Luhe, v. 526, p. 41-53, 2015.

FREEMAN, C.J.; THACKER, R.W.; BAKER, D.M.; FOGEL, M.L. Quality or quantity: is nutrient transfer driven more by symbiont identity and productivity than by symbiont abundance?. **The ISME journal**, London, v. 7, n. 6, p. 1116-1125, 2013.

FREEMAN, M.F.; VAGSTAD, A.L.; PIEL, J. Polytheonamide biosynthesis showcasing the metabolic potential of sponge-associated uncultivated 'Entotheonella' bacteria. **Current opinion in chemical biology**, London, v. 31, p. 8-14, 2016.

FRIEDRICH, A.B.; MERKERT, H.; FENDERT, T.; HACKER, J.; PROKSCH, P.; HENTSCHEL, U. Microbial diversity in the marine sponge *Aplysina cavernicola* (formerly *Verongia cavernicola*) analyzed by fluorescence in situ hybridization (FISH). **Marine biology**, Berlin, v. 134, n. 3, p. 461-470, 1999.

FUHRMAN, J.A.; CRAM, J.A.; NEEDHAM, D.M. Marine microbial community dynamics and their ecological interpretation. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 13, n. 3, p. 133-146, 2015.

GAO, Z-M.; WANG, Y.; TIAN, R-M.; WONG, Y.H.; BATANG, Z.B.; AL-SUWAILEM, A.M.; BAJIC, V.B.; QIAN, P-Y. Symbiotic adaptation drives genome streamlining of the cyanobacterial sponge symbiont "Candidatus Synechococcus spongiarum." **mBio**, Washington, v. 5, n. 2, p. e00079-14, 2014.

GAUTHIER, M.E.; DU PASQUIER, L.; DEGNAN, B.M. The genome of the sponge *Amphimedon queenslandica* provides new perspectives into the origin of Toll-like and interleukin 1 receptor pathways. **Evolution & Development**, Malden, v. 12, n. 5, p. 519-533, 2010.

GAZAVE, E.; LAPÉBIE, P.; ERESKOVSKY, A.V.; VACELET, J.; RENARD, E.; CÁRDENAS, P.; BORCHIELLINI, C. No longer demospongiae: homoscleromorpha formal nomination as a fourth class of Porifera. **Hydrobiologia**, Den Haag, v. 687, n. 1, p. 3-10, 2012.

GERWICK, W.H.; MOORE, B.S. Lessons from the past and charting the future of marine natural products drug discovery and chemical biology. **Chemistry & biology**, London, v. 19, n. 1, p. 85-98, 2012.

GIDDINGS, L.A.; NEWMAN, D.J. **Bioactive compounds from marine extremophiles**. New York: Springer International, 2015. 124 p.

GILES, E.C.; KAMKE, J.; MOITINHO-SILVA, L.; TAYLOR, M.W.; HENTSCHEL, U.; RAVASI, T.; SCHMITT, S. Bacterial community profiles in low microbial abundance sponges. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 83, n. 1, p. 232-241, 2013.

GLOECKNER, V.; HENTSCHEL, U.; ERESKOVSKY, A.V.; SCHMITT, S. Unique and species-specific microbial communities in *Oscarella lobularis* and other Mediterranean *Oscarella* species (Porifera: Homoscleromorpha). **Marine biology**, Berlin, v. 160, n. 4, p. 781-791, 2013a.

GLOECKNER, V.; LINDQUIST, N.; SCHMITT, S.; HENTSCHEL, U. Ectyoplasia ferox, an experimentally tractable model for vertical microbial transmission in marine sponges. **Microbial ecology**, New York, v. 65, n. 2, p. 462-474, 2013b.

GLOECKNER, V.; WEHRL, M.; MOITINHO-SILVA, L.; GERNERT, C.; SCHUPP, P.; PAWLIK, J.R.; LINDQUIST, N.L.; ERPENBECK, D.; WÖRHEIDE, G.; HENTSCHEL, U. The HMA-LMA dichotomy revisited: an electron microscope survey of 56 sponge species. **The Biological Bulletin**, Lancaster, v. 227, n. 1, p. 78-88, 2014.

GOEIJ, J.M.; VAN OEVELEN, D.; VERMEIJ, M.J.; OSINGA, R.; MIDDELBURG, J.J.; DE GOEIJ, A.F.; ADMIRAAL, W. Surviving in a marine desert: the sponge loop retains resources within coral reefs. **Science**, New York, v. 342, n. 6154, p. 108-110, 2013.

GROZDANOV, L.; HENTSCHEL, U. An environmental genomics perspective on the diversity and function of marine sponge-associated microbiota. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 10, n. 3, p. 215-220, 2007.

GU, B.; HE, S.; YAN, X.; ZHANG, L. Tentative biosynthetic pathways of some microbial diketopiperazines. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 97, n. 19, p. 8439-8453, 2013.

HARDOIM, C.C.; COSTA, R. Temporal dynamics of prokaryotic communities in the marine sponge *Sarcotragus spinosulus*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 23, n. 12, p. 3097-3112, 2014.

HARDOIM, C.C.; ESTEVES, A.I.; PIRES, F.R.; GONÇALVES, J.M.; COX, C.J.; XAVIER, J.R.; COSTA, R. Phylogenetically and spatially close marine sponges harbour divergent bacterial communities. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 12, p. e53029, 2012.

HARDOIM, C.C.P.; CARDINALE, M.; CÚCIO, A.C.B.; ESTEVES, A.I.S.; BERG, G.; XAVIER, J.R.; COX, C.J.; COSTA, R. Effects of sample handling and cultivation bias on the specificity of bacterial communities in keratose marine sponges. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 5, n. 611, p. 1-15, 2014.

HENTSCHEL, U.; USHER, K.M.; TAYLOR, M.W. Marine sponges as microbial fermenters. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 55, n. 2, p. 167-177, 2006.

HENTSCHEL, U.; PIEL, J.; DEGNAN, S.M.; TAYLOR, M.W. Genomic insights into the marine sponge microbiome. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 10, n. 9, p. 641-654, 2012.

HENTSCHEL, U.; FIESELER, L.; WEHRL, M.; GERNERT, C.; STEINERT, M.; HACKER, J.; HORN, M. Microbial diversity of marine sponges. **Progress in Molecular and Subcellular Biology**, New York, v. 37, p. 59-88, 2003.

HENTSCHEL, U.; HOPKE, J.; HORN, M.; FRIEDRICH, A.B.; WAGNER, M.; HACKER, J.; MOORE, B.S. Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 9, p. 4431-4440, 2002.

HOFFMANN, F.; LARSEN, O.; THIEL, V.; RAPP, H.T.; PAPE, T.; MICHAELIS, W.; REITNER, J. An anaerobic world in sponges. **Geomicrobiology Journal**, New York, v. 22, n. 1/2, p. 1-10, 2005.

HOFFMANN, F.; RADAX, R.; WOEBKEN, D.; HOLTAPPELS, M.; LAVIK, G.; RAPP, H.T.; SCHLÄPPY, M.-L.; SCHLEPER, C.; KUYPERS, M. M. Complex nitrogen cycling in the sponge *Geodia barretti*. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 11, n. 9, p. 2228-2243, 2009.

HOFFMANN, F.; RAPP, H.T.; REITNER, J. Monitoring microbial community composition by fluorescence in situ hybridization during cultivation of the marine cold-water sponge *Geodia barretti*. **Marine Biotechnology**, New York, v. 8, n. 4, p. 373-379, 2006.

HOOPER, J.N.; LÉVI, C. Biogeography of indo-west pacific sponges: Microcionidae, Raspailiidae, Axinellidae. In: VAN SOEST, R.W.M.; VAN KEMPEN, T.M.G.; BRAEKMAN, J.-C. **Sponges in time and space**. Rotterdam: Balkema, 1994. p. 191-212.

HOOPER, J.N.; VAN SOEST, R.W. Systema Porifera: a guide to the classification of sponges. In: HOOPER, J.; VAN SOEST, R.; WILLENZ, P. (Ed.). **Systema Porifera**, New York: Kluwer Academic, 2002. v. 1, p. 1-7.

JACKSON, S.A.; KENNEDY, J.; MORRISSEY, J.P.; O'GARA, F.; DOBSON, A.D. Pyrosequencing reveals diverse and distinct sponge-specific microbial communities in sponges from a single geographical location in Irish waters. **Microbial ecology**, New York, v. 64, n. 1, p. 105-116, 2012.

JUNG, D.; SEO, E.-Y.; EPSTEIN, S.S.; JOUNG, Y.; HAN, J.; PARFENOVA, V.V.; BELYKH, O.I.; GLADIKH, A.S.; AHN, T. S. Application of a new cultivation technology, I-tip, for studying microbial diversity in freshwater sponges of Lake Baikal, Russia. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 90, n. 2, p. 417-423, 2014.

KENNEDY, J.; MARCHESI, J.R.; DOBSON, A.D. Marine metagenomics: strategies for the discovery of novel enzymes with biotechnological applications from marine environments. **Microbial Cell Factories**, London, v. 7, n. 1, p. 1, 2008.

KENNEDY, J.; FLEMER, B.; JACKSON, S.A.; MORRISSEY, J.P.; O'GARA, F.; DOBSON, A.D. Evidence of a putative deep sea specific microbiome in marine sponges. **PloS One**, San Francisco, v. 9, n. 3, p. e91092, 2014.

LAPORT, M.S.; SANTOS, O.C.S.; MURICY, G. Marine sponges: potential sources of new antimicrobial drugs. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, Hilversum, v. 10, n. 1, p. 86-105, 2009.

LAVY, A.; KEREN, R.; HABER, M.; SCHWARTZ, I.; ILAN, M. Implementing sponge physiological and genomic information to enhance the diversity of its culturable associated bacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 87, n. 2, p. 486-502, 2014.

LEE, O.O.; CHUI, P.Y.; WONG, Y.H.; PAWLIK, J.R.; QIAN, P.Y. Evidence for vertical transmission of bacterial symbionts from adult to embryo in the Caribbean sponge *Svenzea zeai*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 19, p. 6147-6156, 2009.

LEE, O.O.; WANG, Y.; YANG, J.; LAFI, F.F.; AL-SUWAILEM, A.; QIAN, P.Y. Pyrosequencing reveals highly diverse and species-specific microbial communities in sponges from the Red Sea. **The ISME Journal**, London, v. 5, n. 4, p. 650-664, 2011.

LEVI, C.; PORTE, A. Electron microscopy study of the sponge *Oscarella lobularis* and its amphiblastula larvae. **Cahiers de Biologie Marine**, Paris, v. 3, p. 307-315, 1962.

LEY, R.E.; HAMADY, M.; LOZUPONE, C.; TURNBAUGH, P.J.; RAMEY, R.R.; BIRCHER, J.S.; SCHLEGEL, M.L.; TUCKER, T.A.; SCHRENZEL, M.D.; KNIGHT, R.; GORDON, J.I. Evolution of mammals and their gut microbes. **Science**, New York, v. 320, n. 5883, p. 1647-1651, 2008.

LIU, M.; FAN, L.; ZHONG, L.; KJELLEBERG, S.; THOMAS, T. Metaproteogenomic analysis of a community of sponge symbionts. **The ISME Journal**, London, v. 6, n. 8, p. 1515-1525, 2012.

LOVE, G.D.; GROSJEAN, E.; STALVIES, C.; FIKE, D. A.; GROTZINGER, J. P.; BRADLEY, A. S.; KELLY, A.E.; BHATIA, M.; MEREDITH, W.; SNAPE, C.E.; BOWRING, S. A.; CONDON, D.J.; SUMMONS, R.E. Fossil steroids record the appearance of Demospongiae during the Cryogenian period. **Nature**, London, v. 457, n. 7230, p. 718-721, 2009.

LYNCH, M.D.; NEUFELD, J.D. Ecology and exploration of the rare biosphere. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 13, n. 4, p. 217-229, 2015.

MALDONADO, M.; RIBES, M.; VAN DUYL, F.C. Nutrient fluxes through sponges: biology, budgets, and ecological implications. **Advances in Marine Biology**, London, v. 62, p. 113-182, 2012.

MANZ, W.; ARP, G.; SCHUMANN-KINDEL, G.; SZEWZYK, U.; REITNER, J. Widefield deconvolution epifluorescence microscopy combined with fluorescence in situ hybridization reveals the spatial arrangement of bacteria in sponge tissue. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 40, n. 2, p. 125-134, 2000.

MCCLINTOCK, J.B.; AMSLER, C.D.; BAKER, B.J.; VAN SOEST, R.W. Ecology of Antarctic marine sponges: an overview. **Integrative and Comparative Biology**, Oxford, v. 45, n. 2, p. 359-368, 2005.

MEYER, A.; CHRISMAN, J.; MOREIRA, J.C.; KOIFMAN, S. Cancer mortality among agricultural workers from Serrana Region, state of Rio de Janeiro, Brazil. **Environmental Research**, Amsterdam, v. 93, n. 3, p. 264-271, 2003.

MOHAMED, N.M.; CICIRELLI, E.M.; KAN, J.; CHEN, F.; FUQUA, C.; HILL, R.T. Diversity and quorum-sensing signal production of Proteobacteria associated with marine sponges. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 10, n. 1, p. 75-86, 2008.

MOITINHO-SILVA, L.; BAYER, K.; CANNISTRACI, C.V.; GILES, E.C.; RYU, T.; SERIDI, L.; RAVASI, T.; HENTSCHEL, U. Specificity and transcriptional activity of microbiota associated with low and high microbial abundance sponges from the Red Sea. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 23, n. 6, p. 1348-1363, 2014.

MONTALVO, N.F.; HILL, R.T. Sponge-associated bacteria are strictly maintained in two closely related but geographically distant sponge hosts. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, n. 20, p. 7207-7216, 2011.

MONTALVO, N.F.; DAVIS, J.; VICENTE, J.; PITTIGLIO, R.; RAVEL, J.; HILL, R.T. Integration of culture-based and molecular analysis of a complex sponge-associated bacterial community. **PloS One**, San Francisco, v. 9, n. 3, p. e90517, 2014.

MORROW, C.; CÁRDENAS, P. Proposal for a revised classification of the Demospongiae (Porifera). **Frontiers in Zoology**, London, v. 12, n. 1, p. 1, 2015.

MORROW, C.C.; PICTON, B.E.; ERPENBECK, D.; BOURY-ESNAULT, N.; MAGGS, C.A.; ALLCOCK, A.L. Congruence between nuclear and mitochondrial genes in Demospongiae: A new hypothesis for relationships within the G4 clade (Porifera: Demospongiae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 62, n. 1, p. 174-190, 2012.

MORROW, C.C.; REDMOND, N.E.; PICTON, B.E.; THACKER, R.W.; COLLINS, A.G.; MAGGS, C.A.; SIGWART, J.D.; ALLCOCK, A.L. Molecular phylogenies support homoplasy of multiple morphological characters used in the taxonomy of Heteroscleromorpha (Porifera: Demospongiae). **Integrative and comparative biology**, Oxford, v. 53, n. 3, p. 428-446, 2013.

MORROW, K.M.; BOURNE, D.G.; HUMPHREY, C.; BOTTÉ, E.S.; LAFFY, P.; ZANEVELD, J.; UTHICKE, S.; FABRICIUS, K.E.; WEBSTER, N.S. Natural volcanic CO₂ seeps reveal future trajectories for host-microbial associations in corals and sponges. **The ISME Journal**, London, v. 9, n. 4, p. 894-908, 2015.

MUELLER, B.; DE GOEIJ, J.M.; VERMEIJ, M.J.; MULDER, Y.; VAN DER ENT, E.; RIBES, M.; VAN DUYL, F.C. Natural diet of coral-excavating sponges consists mainly of dissolved organic carbon (DOC). **PloS One**, San Francisco, v. 9, n. 2, p. e90152, 2014.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Marine-sourced anti-cancer and cancer pain control agents in clinical and late preclinical development. **Marine Drugs**, Basel, v. 12, n. 1, p. 255-278, 2014.

NGUYEN, M.T.; LIU, M.; THOMAS, T. Ankyrin repeat proteins from sponge symbionts modulate amoebal phagocytosis. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 23, n. 6, p. 1635-1645, 2014.

NOYER, C.; HAMILTON, A.; SACRISTAN-SORIANO, O.; BECERRO, M.A. Quantitative comparison of bacterial communities in two Mediterranean sponges. **Symbiosis**, Philadelphia, v. 51, n. 3, p. 239-243, 2010.

OCHMAN, H.; WROBEY, M.; KUO, C-H.; NDJANGO, J-B.N.; PEETERS, M.; HAHN, B.H.; HUGENHOLTZ, P. Evolutionary relationships of wild hominids recapitulated by gut microbial communities. **PLoS Biology**, San Francisco, v. 8, n. 11, p. e1000546, 2010

OLSON, J.B.; LORD, C.C.; MCCARTHY, P.J. Improved recoverability of microbial colonies from marine sponge samples. **Microbial Ecology**, Oxford, v. 40, n. 2, p. 139-147, 2000.

PENG, J.; SHEN, X.; EL SAYED, K.A.; DUNBAR, D.C.; PERRY, T.L.; WILKINS, S.P.; HAMANN, M.T. Marine natural products as prototype agrochemical agents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, n. 8, p. 2246-2252, 2003.

PIEL, J.; HUI, D.; WEN, G.; BUTZKE, D.; PLATZER, M.; FUSETANI, N.; MATSUNAGA, S. Antitumor polyketide biosynthesis by an uncultivated bacterial symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 101, n. 46, p. 16222-16227, 2004.

PILE, A.J.; PATTERSON, M.R.; WITMAN, J.D. In situ grazing on plankton < 10 µm by the boreal sponge *Mycale lingua*. **Marine Ecology Progress Series**, Oldendorf/Luhe, v. 141, p. 95-102, 1996.

PIMENTEL-ELARDO, S.; WEHRL, M.; FRIEDRICH, A.B.; JENSEN, P.R.; HENTSCHEL, U. Isolation of planctomycetes from Aplysina sponges. **Aquatic Microbial Ecology**, Oldendorf/Luhe, v. 33, p. 239-245, 2003.

PITA, L.; ERWIN, P.M.; TURON, X.; LÓPEZ-LEGENTIL, S. Till death do us part: Stable sponge-bacteria associations under thermal and food shortage stresses. **PloS One**, San Francisco, v. 8, n. 11, p. e80307, 2013a.

PITA, L.; TURON, X.; LÓPEZ-LEGENTIL, S.; ERWIN, P.M. Host rules: spatial stability of bacterial communities associated with marine sponges (*Ircinia spp.*) in the Western Mediterranean Sea. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 86, n. 2, p. 268-276, 2013b.

RADAX, R.; HOFFMANN, F.; RAPP, H.T.; LEININGER, S.; SCHLEPER, C. Ammonia-oxidizing archaea as main drivers of nitrification in cold-water sponges. **Environmental microbiology**, Oxford, v. 14, n. 4, p. 909-923, 2012a.

RADAX, R.; RATTEI, T.; LANZEN, A.; BAYER, C.; RAPP, H.T.; URICH, T.; SCHLEPER, C. Metatranscriptomics of the marine sponge *Geodia barretti*: tackling phylogeny and function of its microbial community. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 14, n. 5, p. 1308-1324, 2012b.

REDMOND, N.E.; MORROW, C.C.; THACKER, R.W.; DIAZ, M.C.; BOURY-ESNAULT, N.; CÁRDENAS, P.; HAJDU, E.; LÓBO-HADJU, G.; PICTON, B.E.; POMPONI, S.A.; KAYAL, E.; COLLINS, A.G. Phylogeny and systematics of Demospongiae in light of new small-subunit ribosomal DNA (18S) sequences. **Integrative and comparative biology**, Oxford, v. 53, n. 3, p. 388-415, 2013.

REISWIG, H.M. Particle feeding in natural populations of three marine demosponges. **The Biological Bulletin**, Lancaster, v. 141, n. 3, p. 568-591, 1971.

_____. Bacteria as food for temperate-water marine sponges. **Canadian Journal of Zoology**, Ottawa, v. 53, n. 5, p. 582-589, 1975.

_____. Partial carbon and energy budgets of the bacteriosponge *Verohgia fistularis* (Porifera: Demospongiae) in Barbados. **Marine Ecology**, Berlin, v. 2, n. 4, p. 273-293, 1981.

REVEILLAUD, J.; MAIGNIEN, L.; EREN, A.M.; HUBER, J.A.; APPRILL, A.; SOGIN, M.L.; VANREUSEL, A. Host-specificity among abundant and rare taxa in the sponge microbiome. **The ISME Journal**, London, v. 8, n. 6, p. 1198-1209, 2014.

RIBES, M.; COMA, R.; GILI, J-M. Natural diet and grazing rate of the temperate sponge *Dysidea avara* (Demospongiae, Dendroceratida) throughout an annual cycle. **Marine Ecology Progress Series**, Oldendorf/Luhe, v. 176, p. 179-190, 1999a.

_____. Seasonal variation of particulate organic carbon, dissolved organic carbon and the contribution of microbial communities to the live particulate organic carbon in a shallow near-bottom ecosystem at the Northwestern Mediterranean Sea. **Journal of Plankton Research**, New York, v. 21, n. 6, p. 1077-1100, 1999b.

RIDLEY, C.P.; BERGQUIST, P.R.; HARPER, M.K.; FAULKNER, D.J.; HOOPER, J.N.; HAYGOOD, M.G. Speciation and biosynthetic variation in four dictyoceratid sponges and their cyanobacterial symbiont, *Oscillatoria spongeliae*. **Chemistry & Biology**, London, v. 12, n. 3, p. 397-406, 2005.

RUA, C.P.; GREGORACCI, G.B.; SANTOS, E.O.; SOARES, A.C.; FRANCINI-FILHO, R.B.; THOMPSON, F. Potential metabolic strategies of widely distributed holobionts in the oceanic archipelago of St Peter and St Paul (Brazil). **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 91, n. 6, p. fiv043, 2015.

SCHLÄPPY, M.L.; SCHÖTTNER, S.I.; LAVIK, G.; KUYPERS, M.M.; DE BEER, D.; HOFFMANN, F. Evidence of nitrification and denitrification in high and low microbial abundance sponges. **Marine Biology**, Berlin, v. 157, n. 3, p. 593-602, 2010.

SCHMIDT, I. Phagocytose et pinocytose chez les Spongillidae. **Zeitschrift für vergleichende Physiologie**, Berlin, v. 66, n. 4, p. 398-420, 1970.

SCHMITT, S.; WEISZ, J.B.; LINDQUIST, N.; HENTSCHEL, U. Vertical transmission of a phylogenetically complex microbial consortium in the viviparous sponge *Ircinia felix*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 7, p. 2067-2078, 2007.

SCHMITT, S.; ANGERMEIER, H.; SCHILLER, R.; LINDQUIST, N.; HENTSCHEL, U. Molecular microbial diversity survey of sponge reproductive stages and mechanistic insights into vertical transmission of microbial symbionts. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 24, p. 7694-7708, 2008.

SCHMITT, S.; DEINES, P.; BEHNAM, F.; WAGNER, M.; TAYLOR, M. W. Chloroflexi bacteria are more diverse, abundant, and similar in high than in low microbial abundance sponges. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 78, n. 3, p. 497-510, 2011.

SCHMITT, S.; TSAI, P.; BELL, J.; FROMONT, J.; ILAN, M.; LINDQUIST, N.; PEREZ, T.; RODRIGO, A.; SCHUPP, P.J.; VACELET, J.; WEBSTER, N.; HENTSCHEL, U.; TAYLOR, M.W. Assessing the complex sponge microbiota: core, variable and species-specific bacterial communities in marine sponges. **The ISME Journal**, London, v. 6, n. 3, p. 564-576, 2012.

SCHÖTTNER, S.; HOFFMANN, F.; CÁRDENAS, P.; RAPP, H.T.; BOETIUS, A.; RAMETTE, A. Relationships between host phylogeny, host type and bacterial community diversity in cold-water coral reef sponges. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 2, p. e55505, 2013.

SCHWARTZ, J. **Everything butenolides**. 2014. 872 p. Thesis (PhD) - Bard College, New York, 2014.

SHARP, K.H.; EAM, B.; FAULKNER, D.J.; HAYGOOD, M.G. Vertical transmission of diverse microbes in the tropical sponge *Corticium sp.* **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 2, p. 622-629, 2007.

SIEGL, A.; KAMKE, J.; HOCHMUTH, T.; PIEL, J.; RICHTER, M.; LIANG, C.; DANDEKAR, T.; HENTSCHEL, U. Single-cell genomics reveals the lifestyle of Poribacteria, a candidate phylum symbiotically associated with marine sponges. **The ISME Journal**, London, v. 5, n. 1, p. 61-70, 2011.

SILVA, F.S.P. **Bioprospecção de actinobactérias associadas à esponja marinha *Aplysina fulva*: isolamento, caracterização e produção de compostos bioativos.** 2015. 159 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 2015.

SIMISTER, R.L.; DEINES, P.; BOTTÉ, E.S.; WEBSTER, N.S.; TAYLOR, M.W. Sponge-specific clusters revisited: a comprehensive phylogeny of sponge-associated microorganisms. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 14, n. 2, p. 517-524, 2012.

SIMISTER, R.; TAYLOR, M.W.; ROGERS, K.M.; SCHUPP, P.J.; DEINES, P. Temporal molecular and isotopic analysis of active bacterial communities in two New Zealand sponges. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 85, n. 1, p. 195-205, 2013.

SIMPSON, T.L. **The cell biology of sponges.** New York, Springer-Verlag, 1984. 627 p.

SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA DEFESA VEGETAL. **Estatística do setor 2015.** Disponível em: <<http://sindiveg.org.br/balanco-2015-setor-de-agroquimicos-confirma-queda-de-vendas/>>. Acesso em: 10 ago. 2016.

SIPKEMA, D.; SCHIPPERS, K.; MAALCKE, W.J.; YANG, Y.; SALIM, S.; BLANCH, H.W. Multiple approaches to enhance the cultivability of bacteria associated with the marine sponge *Haliclona (gellius) sp.* **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 77, n. 6, p. 2130-2140, 2011.

SIPKEMA, D.; CARALT, S.; MORILLO, J.A.; AL-SOUD, W.A.; SØRENSEN, S.J.; SMIDT, H.; URIZ, M.J. Similar sponge-associated bacteria can be acquired via both vertical and horizontal transmission. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 17, n. 10, p. 3807-3821, 2015.

STEINERT, G.; WHITFIELD, S.; TAYLOR, M.W.; THOMS, C.; SCHUPP, P.J. Application of diffusion growth chambers for the cultivation of marine sponge-associated bacteria. **Marine Biotechnology**, New York, v. 16, n. 5, p. 594-603, 2014.

SU, J.; JIN, L.; JIANG, Q.; SUN, W.; ZHANG, F.; LI, Z. Phylogenetically diverse ure C genes and their expression suggest the urea utilization by bacterial symbionts in marine sponge *Xestospongia testudinaria*. **PloS One**, San Francisco, v. 8, n. 5, p. e64848, 2013.

TAYLOR, M.W.; RADAX, R.; STEGER, D.; WAGNER, M. Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology, and biotechnological potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 71, n. 2, p. 295-347, 2007.

TAYLOR, M.W.; SCHUPP, P.J.; BAILLIE, H.J.; CHARLTON, T.S.; DE NYS, R.; KJELLEBERG, S.; STEINBERG, P.D. Evidence for acyl homoserine lactone signal production in bacteria associated with marine sponges. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 7, p. 4387-4389, 2004.

TAYLOR, M.W.; TSAI, P.; SIMISTER, R.L.; DEINES, P.; BOTTE, E.; ERICSON, G.; SCHMITT, S.; WEBSTER, N.S. 'Sponge-specific' bacteria are widespread (but rare) in diverse marine environments. **The ISME Journal**, London, v. 7, n. 2, p. 438-443, 2013.

THACKER, R.W.; FREEMAN, C.J. Sponge-microbe symbioses: recent advances and new directions. **Advances in Marine Biology**, New York, v. 62, p. 57, 2012.

THACKER, R.W.; STARNES, S. Host specificity of the symbiotic cyanobacterium *Oscillatoria spongeliae* in marine sponges, *Dysidea spp.* **Marine Biology**, Berlin, v. 142, n. 4, p. 643-648, 2003.

THIEL, V.; NEULINGER, S.C.; STAUFENBERGER, T.; SCHMALJOHANN, R.; IMHOFF, J.F. Spatial distribution of sponge-associated bacteria in the Mediterranean sponge *Tethya aurantium*. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 59, n. 1, p. 47-63, 2007.

THOMAS, T.; MOITINHO-SILVA, L.; LURGI, M.; BJÖRK, J.R.; EASSON, C.; ASTUDILLO-GARCÍA, C.; OLSON, J.B.; ERWIN, P.M.; LÓPEZ-LEGENTIL, S.; LUTER, H.; CHAVES-FONNEGRA, A.; COSTA, R.; SCHUPP, P.J.; STEINDLER, L.; ERPENBECK, D.; GILBERT, G.; KNIGHT, R.; ACKERMANN, G.; LOPEZ, J.V.; TAYLOR, M.W.; THACKER, R.W.; MONTOYA, J.M.; HENTSCHEL, U.; WEBSTER, N.S. Diversity, structure and convergent evolution of the global sponge microbiome. **Nature Communications**, London, v. 7, n. 11870, p. 1-12, 2016.

TIAN, R.M.; WANG, Y.; BOUGOUFFA, S.; GAO, Z.M.; CAI, L.; BAJIC, V.; QIAN, P.Y. Genomic analysis reveals versatile heterotrophic capacity of a potentially symbiotic sulfur-oxidizing bacterium in sponge. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 16, n. 11, p. 3548-3561, 2014.

TURQUE, A.S.; BATISTA, D.; SILVEIRA, C.B.; CARDOSO, A.M.; VIEIRA, R.P.; MORAES, F.C.; CLEMENTINO, M.M.; ALBANO, R.M.; PARANHOS, R.; MARTINS, O.B.; MURICY, G. Environmental shaping of sponge associated archaeal communities. **PLoS One**, San Francisco, v. 5, n. 12, p. e15774, 2010.

VACELET, J.; BOURY-ESNAULT, N. Carnivorous sponges. **Nature**, London, v. 373, n. 6512, p. 333-335, 1995.

VACELET, J.; DONADEY, C. Electron microscope study of the association between some sponges and bacteria. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, Amsterdam, v. 30, n. 3, p. 301-314, 1977.

VAN PÉE, K.H.; PATALLO, E.P. Flavin-dependent halogenases involved in secondary metabolism in bacteria. **Applied microbiology and biotechnology**, Berlin, v. 70, n. 6, p. 631-641, 2006.

VAN SOEST, R.W.; BOURY-ESNAULT, N.; VACELET, J.; DOHRMANN, M.; ERPENBECK, D.; DE VOOGD, N.J.; SANTODOMINGO, N.V.; VANHOORNE, B.; KELLY, M.; HOOPER, J.N. Global diversity of sponges (Porifera). **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 4, p. e35105, 2012.

VOGEL, S. Current-induced flow through living sponges in nature. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 74, n. 5, p. 2069-2071, 1977.

WANG, G. Diversity and biotechnological potential of the sponge-associated microbial consortia. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 33, n. 7, p. 545-551, 2006.

WATERS, A.L.; PERAUD, O.; KASANA, N.; SIMS, J.W.; KOTHALAWALA, N.; ANDERSON, M.A.; ABBAS, S.H.; RAO, K.V.; JUPALLY, V.R.; KELLY, M.; DASS, A.; HILL, R.T.; HAMANN, M.T. An analysis of the sponge *Acanthostrongylophora* sp. microbiome yields an actinomycete that produces the natural product manzamine A. **Frontiers in Marine Science**, Lausanne, v. 1, p. 54, 2014.

WEBSTER, N.S.; TAYLOR, M.W. Marine sponges and their microbial symbionts: love and other relationships. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 14, n. 2, p. 335-346, 2012.

WEBSTER, N.S.; THOMAS, T. The Sponge Hologenome. **mBio**, Washington, v. 7, n. 2, p. e00135-16, 2016.

WEBSTER, N.S.; WATTS, J.E.; HILL, R.T. Detection and phylogenetic analysis of novel crenarchaeote and euryarchaeote 16S ribosomal RNA gene sequences from a Great Barrier Reef sponge. **Marine Biotechnology**, New York, v. 3, n. 6, p. 600-608, 2001.

WEBSTER, N.S.; LUTER, H.M.; SOO, R.M.; BOTTÉ, E.S.; SIMISTER, R.L.; ABDO, D.; WHALAN, S. Same, same but different: symbiotic bacterial associations in GBR sponges. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 3, n. 444, p. 1-11, 2013.

WEBSTER, N.S.; TAYLOR, M.W.; BEHNAM, F.; LÜCKER, S.; RATTEI, T.; WHALAN, S.; HORN, M.; WAGNER, M. Deep sequencing reveals exceptional diversity and modes of transmission for bacterial sponge symbionts. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 12, n. 8, p. 2070-2082, 2010.

WEISZ, J.B.; LINDQUIST, N.; MARTENS, C.S. Do associated microbial abundances impact marine demosponge pumping rates and tissue densities? **Oecologia**, Berlin, v. 155, n. 2, p. 367-376, 2008.

WEISZ, J.B.; HENTSCHEL, U.; LINDQUIST, N.; MARTENS, C.S. Linking abundance and diversity of sponge-associated microbial communities to metabolic differences in host sponges. **Marine Biology**, Berlin, v. 152, n. 2, p. 475-483, 2007.

WHITE, J.R.; PATEL, J.; OTTESEN, A.; ARCE, G.; BLACKWELDER, P.; LOPEZ, J.V. Pyrosequencing of bacterial symbionts within *Axinella corrugata* sponges: diversity and seasonal variability. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 6, p. e38204, 2012.

WILKINSON, C.R. Microbial associations in sponges. II. Numerical analysis of sponge and water bacterial populations. **Marine Biology**, Berlin, v. 49, n. 2, p. 169-176, 1978.

_____. Net primary productivity in coral reef sponges. **Science**, New York, v. 219, n. 4583, p. 410-412, 1983.

WILKINSON, C.R.; GARRONE, R.; VACELET, J. Marine sponges discriminate between food bacteria and bacterial symbionts: electron microscope radioautography and in situ evidence. **Proceedings of the Royal Society of London. B: Biological Sciences**, London, v. 220, n. 1221, p. 519-528, 1984.

WILKINSON, C.R.; NOWAK, M.; AUSTIN, B.; COLWELL, R.R. Specificity of bacterial symbionts in Mediterranean and Great Barrier Reef sponges. **Microbial Ecology**, New York, v. 7, n. 1, p. 13-21, 1981.

WILSON, M.C.; MORI, T.; RÜCKERT, C.; URIA, A.R.; HELF, M.J.; TAKADA, K.; GERNERT, C.; STEFFENS, U.A.E.; HEYCKE, N.; SCHMITT, S.; RINKE, C.; HELFRICH, E.J.N.; BRACHMANN, A.O.; GURGUI, C.; WAKIMOTO, T.; KRACHT, M.; CRÜSEMANN, M.; HENTSCHEL, U.; ABE, I.; MATSUNAGA, S.; KALINOWSKI, J.; TAKEYAMA, H.; PIEL, J. An environmental bacterial taxon with a large and distinct metabolic repertoire. **Nature**, London, v. 506, n. 7486, p. 58-62, 2014.

WÖRHEIDE, G.; DOHRMANN, M.; ERPENBECK, D.; LARROUX, C.; MALDONADO, M.; VOIGT, O.; BORCHIellini, C.; LAVROV, D.V. 1 Deep phylogeny and evolution of sponges (*Phylum porifera*). In: MIKEL, A.B.; URIZ, M.J.; MALDONADO, M.; TURON, X. (Ed.). **Advances in marine biology**: phylogeny, systematics, ecology. New York: Springer, 2012. v. 61, p. 1-30.

YAHIEL, G.; SHARP, J.H.; MARIE, D.; HÄSE, C.; GENIN, A. In situ feeding and element removal in the symbiont bearing sponge *Theonella swinhoei*: Bulk DOC is the major source for carbon. **Limnology and Oceanography**, Waco, v. 48, n. 1, p. 141-149, 2003.

ZHANG, F.; BLASIAK, L.C.; KAROLIN, J.O.; POWELL, R.J.; GEDDES, C.D.; HILL, R.T. Phosphorus sequestration in the form of polyphosphate by microbial symbionts in marine sponges. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 112, n. 14, p. 4381-4386, 2015.

4 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO BACTERIANA DE ESPONJAS MARINHAS REVELA INFLUÊNCIAS DA FILOGENIA DO HOSPEDEIRO E O AMBIENTE

“Julgue seu sucesso pelas coisas que você
teve que renunciar para conseguir”

- Dalai Lama

Resumo

Comunidades bacterianas associadas à esponjas são influenciadas por fatores ambientais; no entanto, também é esperado algum grau de influência genética do hospedeiro sobre seu microbioma. No presente trabalho, o sequenciamento de fragmentos do gene 16S rRNA revelou diversos filotipos bacterianos baseado nas filogenias de três esponjas tropicais (*Aiolochoia crassa*, *Aplysina fulva* e *Chondrosia collectrix*). Apesar de sua ocorrência simpátrica, as esponjas estudadas apresentaram uma diferente composição bacteriana quando comparadas entre si e diferentes da água do mar. Contudo, menor dissimilaridade na composição das comunidades bacterianas foi claramente observada dentro de espécies do mesmo grupo filogenético. As análises filogenéticas de UTOs detectadas nas esponjas revelaram agrupamentos compostos de sequências bacterianas associados à esponjas, a partir de muitas espécies hospedeiras não relacionadas, e com sequências detectadas em diversas amostras ambientais, tais como, água do mar e sedimento. Além disso, um clado específico relacionado para hospedeiros *Aplysina* foi também encontrado e revelou sua afiliação para os filos Cyanobacteria e Proteobacteria. Isso nos leva a concluir que as comunidades bacterianas associadas às esponjas marinhas aqui estudadas são moldadas pela genética do hospedeiro. No entanto, outros aspectos também podem estar envolvidos na aquisição de bactérias a partir de diferentes fontes no ambiente. Este é o primeiro estudo a acessar as comunidades bacterianas associadas à esponjas marinhas no remoto arquipélago de São Pedro e São Paulo (Brasil) usando sequenciamento de fragmentos do gene 16S rRNA.

Palavras-chave: Simbiontes associados; Aplysinidae; Chondrosidae; Transmissão vertical e horizontal; Verongimorpha; Arquipélago de São Pedro e São Paulo; Brasil

Abstract

Bacterial communities associated with sponges are influenced by environmental factors; however, some degree of genetic influence of the host on the microbiome is also expected. In the present work, 16S rRNA gene amplicon sequencing revealed diverse bacterial phylotypes based on the phylogeny of three tropical sponges (*Aiolochoia crassa*, *Aplysina fulva* and *Chondrosia collectrix*). Despite their sympatric occurrence, the studied sponges presented different bacterial compositions that strongly differed from those observed in seawater. However, lower dissimilarities in bacterial communities were clearly observed within sponges from the same phylogenetic group. Phylogenetic analysis of OTUs recovered from sponges revealed clusters of sponge-associated bacterial sequences from many unrelated host species and sequences retrieved from diverse environmental samples such as seawater and sediment. Additionally, a clade-specific related to *Aplysina* hosts and closely affiliated with the phyla Cyanobacteria and Proteobacteria was observed.

Based on these results, we conclude that the bacterial communities associated with the marine sponges studied here were shaped by host genetics. However, other factors may also be involved in the acquisition of bacterial taxa from different environmental sources. This is the first study to assess bacterial communities associated with marine sponges in the remote St. Peter and St. Paul Archipelago using amplicon sequencing of the 16S rRNA gene.

Keywords: Associated symbionts; Aplysiniidae; Chondrosidae; Vertical and horizontal transmissions; Verongimorpha; St. Peter and St. Paul Archipelago; Brazil

4.1 Introdução

Esponjas (filo Porifera) são os mais antigos dos organismos multicelulares ainda existentes em nosso planeta. Esses animais evoluíram há mais de 600 milhões de anos e atualmente compreendem mais de 8.600 espécies que são distribuídas em habitats aquáticos em todo o mundo. O sucesso evolutivo de esponjas pode estar relacionado à sua capacidade em manter uma rica comunidade de microrganismos que, em alguns casos, pode alcançar mais de 40% de sua biomassa (VACELET et al., 1975; HENTSCHEL et al., 2012). Esses microrganismos desempenham papéis chave na ciclagem de nutrientes (RIBES et al., 2012; FAN et al., 2012) e são considerados importantes agentes moduladores do *fitness* de esponjas, que promove a saúde do hospedeiro e sua habilidade para adaptar a estresses ambientais (ERWIN; THACKER, 2008; HOFFMANN et al., 2009; TURQUE et al., 2010; SIMISTER et al., 2012a; FAN et al., 2013; WEBSTER et al., 2013b). Adicionalmente, o holobionte esponja representa uma fonte valiosa de novidades genéticas e metabólicas, tornando estes animais ainda mais interessantes para a exploração química, genética e ecológica. Contudo, este sistema microbiano permanece pobremente entendido (HARDOIM; COSTA, 2014).

Para compreender totalmente a biologia desses animais é essencial uma investigação detalhada de suas comunidades microbianas associadas. Assim, é necessário concentrar esforços em descrever os fatores ecológicos e evolutivos que influenciam a estrutura e dinâmica dessas comunidades. Interações bactéria-esponja são frequentemente estáveis cruzando escalas temporais e geográficas, e uma parte da microbiota já foi confirmada ser transferida de seus parentais para a prole (HENTSCHEL et al., 2002; TAYLOR et al., 2007; MONTALVO; HILL, 2011; HARDOIM; COSTA, 2014). Deste modo, a co-evolução provavelmente desempenha

um papel importante em moldar as relações hospedeiro-bactéria (ERPENBECK et al., 2002).

Muitos estudos têm focado em acessar a diversidade microbiana em uma variedade de espécies hospedeiras, incluindo esponjas tropicais, para caracterizar a distribuição destes microrganismos em escalas espaço-temporais e a correlação destes, com a saúde do hospedeiro, fenótipo, fisiologia e ecologia (SCHMITT et al., 2012; REVEILLAUD et al., 2014; HARDOIM; COSTA, 2014; OLSON et al., 2014; GAO et al., 2015). As seguintes conclusões gerais têm sido obtidas: (i) bactérias são específicas ao hospedeiro (SCHMITT et al., 2012), (ii) microrganismos associados diferem daqueles de comunidades planctônicas circundantes ao meio (HARDOIM et al., 2012), (iii) apesar de diferenças filogenéticas, os microrganismos compartilham características funcionais que lhes permitem viver em simbiose (FAN et al., 2012) e (iv) algumas espécies de esponjas abrigam uma alta abundância microbiana (AAM), enquanto outras espécies mantêm uma baixa abundância microbiana (BAM) (GLOECKNER et al., 2014).

Embora as comunidades microbianas associadas com esponjas tem sido bastante estudadas, as principais forças dirigindo a regulação da diversidade e atividade microbiana em esponjas permanecem pobremente entendidas. Poucos estudos tem diretamente avaliado as correlações entre a filogenia do hospedeiro e a estrutura da comunidade bacteriana (ERPENBECK et al., 2002; MONTALVO; HILL, 2011; HARDOIM et al., 2012; SCHÖTTNER et al., 2013; EASSON; THACKER, 2014; REVEILLAUD et al., 2014).

Neste trabalho, a filogenia de três esponjas marinhas (*Aiolochoia crassa*, *Aplysina fulva* e *Chondrosia collectrix*) foi examinada para determinar se sua história evolutiva desempenhou um significativo papel em moldar os perfis da comunidade bacteriana. Para este fim, as composições e dissimilaridades de comunidades bacterianas associadas com doze espécimes de esponjas foram caracterizadas. As amostras foram coletadas a partir de esponjas espacialmente próximas uma da outra no remoto Arquipélago de São Pedro e São Paulo (ASPSP), Brasil. Para garantir uma identificação robusta das esponjas alvo, as relações filogenéticas dos hospedeiros foram acessadas usando sequências do fragmento padrão CO1, em contraste com estudos prévios que retiveram nomes taxonômicos para descrever as relações do hospedeiro.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Local de amostragem

O Arquipélago de São Pedro e São Paulo é um dos menores e mais isolados arquipélagos no mundo. Ele está localizado a 1.000 km da cidade de Natal, estado do Rio Grande do Norte, nordeste do Brasil (0 55'02" N, 29 20'44" W) e é uma Área de Proteção Ambiental mantida pela Marinha Brasileira. O arquipélago é formado por dez pequenas ilhas e ilhotas distribuídas em 1,5 ha (Figura 3). A maior parte da costa rochosa é formada por encostas íngremes desprovidas de substratos não consolidados, com exceção da enseada que está gradualmente de 3-20 m de profundidade em um mosaico de fundo rochoso e arenoso.

A fauna marinha única abriga alto endemismo de peixes e esponjas e tem merecido crescente atenção de investigação (EDWARDS; LUBBOCK 1983; MORAES 2011). Apesar da alta pressão de pesca local, o ASPSP pode ser considerado sob relativamente baixa perturbação antropogênica, pelo menos por poluentes industriais e domésticos devido ao seu isolamento do continente e reduzida ocupação humana.

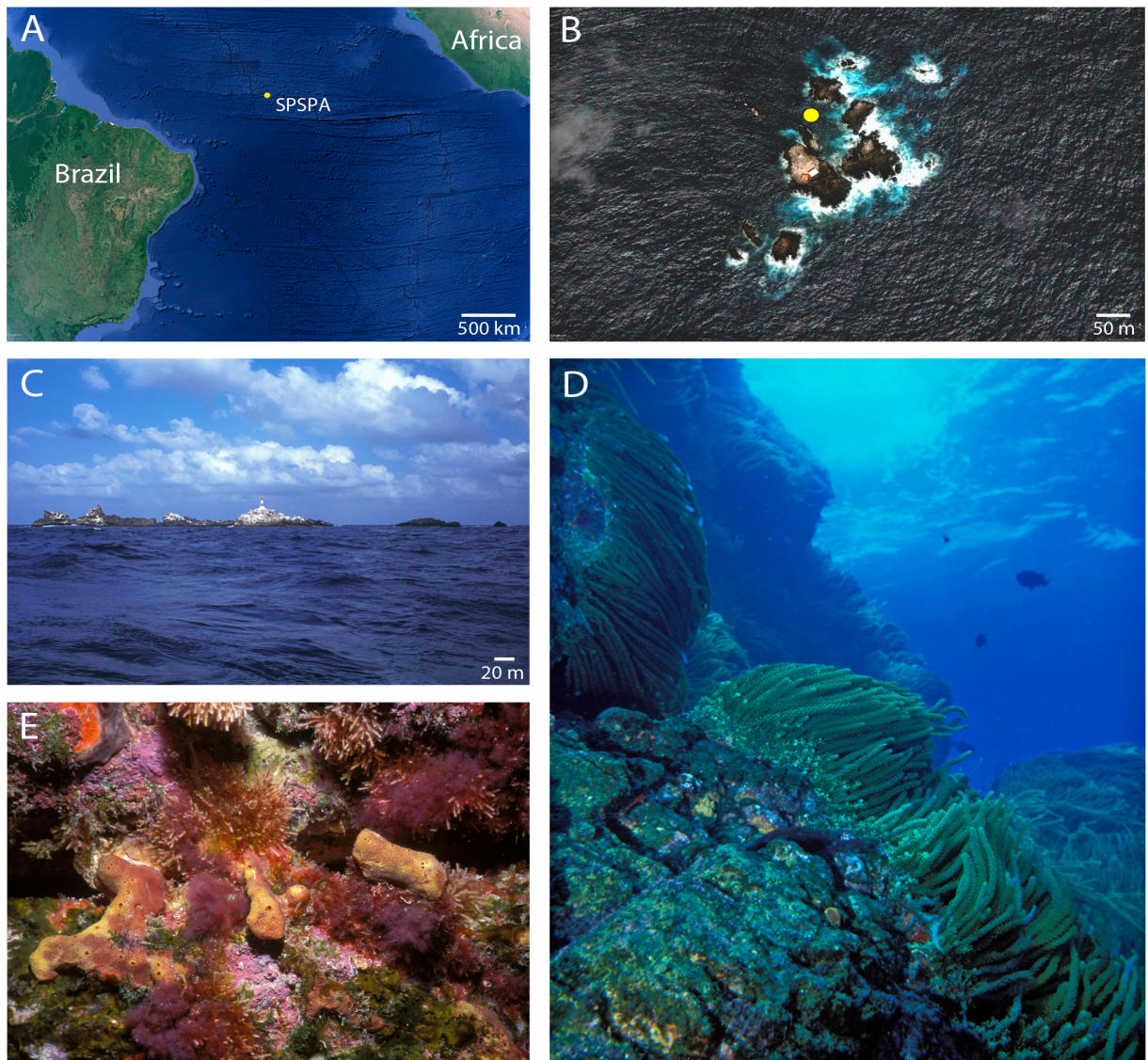


Figura 3 - Arquipélago de São Pedro e São Paulo no Atlântico Equatorial ($0^{\circ} 55'02''$ N, $29^{\circ} 20'44''$ W) e aspectos *in situ* do sítio de amostragem. **A**, mapa mostrando a posição do arquipélago; **B**, imagem de satélite do ASPSP com local de amostragem na enseada (ponto amarelo); **C**, vista oeste do ASPSP; **D**, costa rochosa na enseada a 15 m de profundidade; **E**, imagem aproximada de bentos mostrando *A. fulva* e *C. collectrix* (massa amarela no centro e incrustantes preto no canto superior esquerdo, respectivamente). A e B, imagens de satélite (SIO NOAA, US Navy, NGA GEBCO) / *Pro software Google Earth*; C-E, fotografias *in situ* por F. Moraes

4.2.2 Amostragem de esponjas e água do mar

Doze espécimes de esponjas pertencentes a três espécies, em profundidade similar (14-15 m) e localizadas a poucos metros um do outro, foram amostradas por mergulho autônomo. Um pequeno fragmento de cada espécime foi coletado e colocado separadamente em tubos Falcon de 50 mL contendo água do mar e estocados no gelo para transporte ao laboratório. Essas esponjas foram morfológicamente identificadas como pertencentes para às famílias Aplysiniidae: *Aiolochoia crassa* (Hyatt 1875) e *Aplysina fulva* (Pallas, 1766); e Chondrosidae: *Chondrosia collectrix* (Schmidt 1870), todas incluídas na sub-classe Verongimorpha (MORAES 2011; ERPENBECK et al., 2012). Inferência filogenética dos espécimes de esponjas foi aqui utilizada para garantir a identificação molecular das espécies. Este procedimento foi realizado utilizando sequenciamento da subunidade 1 do gene mitocondrial citocromo c oxidase (mtCO1) (MEYER et al., 2005; ROT et al., 2006; ERPENBECK et al., 2012).

Água do mar foi coletada no sítio de amostragem das esponjas usando uma garrafa de Van Dorn e filtradas com uma membrana de policarbonato de 0,22 µm (Millipore, MA, USA). Essas amostras de água do mar foram usadas para confirmar que as comunidades bacterianas associadas à esponjas foram específicas a estes animais e não amplificadas do DNA na água do mar.

4.2.3 Análise da comunidade bacteriana usando sequenciamento do gene 16S rRNA

No laboratório, os espécimes de esponjas foram cuidadosamente limpos com água do mar artificial auto-clavada (33 g L⁻¹ Red Sea Salt®, Red Sea, Houston, TX, USA) e cortados em pequenos pedaços com um bisturi. O DNA total de todas as amostras foi isolado usando o *kit* comercial *Power Soil DNA isolation* (Mo Bio, Carlsbad, CA, USA) seguindo instruções do fabricante, usando 0,25 g do tecido da esponja ou a membrana usada para filtrar as amostras de água do mar.

A região hipervariável do gene 16S rRNA foi amplificada por PCR usando o conjunto de oligonucleotídeos 967F (CAA CGC GAA GAA CCT TAC C; SOGIN et al., 2006) e 1193R (CGT CRT CCC CRC CTT CC; WANG; QIAN, 2009), os quais geram fragmentos de cerca de 230 pb de comprimento. Entretanto, um primer

diferente, 967F, com um “barcode” de cinco nucleotídeos foi sintetizado para cada amostra (<http://vamps.mbl.edu/>).

As reações de PCR foram realizadas de acordo com Kavamura et al., (2013). Após amplificação, todos fragmentos contendo os “barcodes” foram misturados em iguais concentrações e purificados usando Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). A PCR em emulsão foi realizada usando o Ion OneTouch 2™ com o Ion Template PGM™ OT2 400 Kit (Life Technologies) de acordo com instruções do fabricante. As bibliotecas de fragmentos do gene 16S rRNA foram sequenciadas sob um Ion 316™ Chip Kit v2 usando o sistema Ion Torrent (Personal Genome Machine™).

Após sequenciamento, todas as leituras foram filtradas pelo software PGM para remover sequências de baixa qualidade e policlonais. O arquivo de sequências (.fastq) foi exportado e analisado como descrito abaixo.

4.2.4 Processamento de sequências e assinaturas taxonômicas

Sequências brutas foram filtradas por qualidade (média de escore de qualidade=25, tamanho da janela=5 bases e número máximo de homopolímeros=6) e ajustadas para um comprimento mínimo de 200 pb usando o software Galaxy (<https://main.g2.bx.psu.edu>). Após processamento, 120.179 sequências foram analisadas usando o *software Quantitative Insights Into Microbial Ecology* (QIIME) versão 1.8 (CAPORASO et al., 2010a). O *kit* de ferramentas QIIME foi aplicado para determinação das unidades taxonômicas operacionais (UTOs) a 97% de similaridade usando o método UCLUST (EDGAR, 2010). Uma sequência representativa de cada UTO foi alinhada contra um arquivo Greengenes por empregar o algoritmo NAST (CAPORASO et al., 2010b). Sequências quimeras foram removidas usando o método UCHIME (EDGAR et al., 2011). As classificações taxonômicas foram realizadas usando o método de classificação UCLUST e comparações com sequências de referências do banco de dados Greengenes (MCDONALD et al., 2012). Sequências não alvo (ex. cloroplastos, mitocôndrias, *singletons* e leituras não classificadas ao nível de domínio “*no-blast hit*”) foram removidas do conjunto de dados. Após processamento, 86.288 sequências foram classificadas para 2.112 UTOs (Tabela 1, Anexo A) e uma tabela final de amostras *versus* UTOs foi criada e usada em análises posteriores.

4.2.5 Análises estatística dos dados de sequenciamento

O número de sequências foi normalizado para o menor esforço de amostragem, compreendendo 3.040 sequências em cada conjunto de dados e expressado como uma porcentagem do total para cada amostra. O *script* `beta_diversity_through_plots.py` foi utilizado para calcular distâncias de beta diversidade entre as amostras (unweighted UniFrac e Bray Curtis) e para construir *plots* de componentes principais (PCoA), assim contando para ambas composições filogenéticas (LOZUPONE et al., 2011) e abundância relativa de taxa (BRAY; CURTIS 1957). Para testar significantes agrupamentos de amostras baseado nestas matrizes de distância, PERMANOVA e ANOSIM foram empregadas usando o *script* `compare_categories.py` no QIIME.

A extensão para quais as UTOs foram compartilhadas ou únicas entre as amostras foi visualizada usando diagramas de Venn-Euller. Esta análise foi realizada utilizando: (i) UTOs detectadas em todo o conjunto de dados (esponjas e água do mar) e (ii) UTOs que foram detectadas nas quatro amostras por espécie de esponja. As UTOs que ocorreram simultaneamente em esponjas e água do mar não foram consideradas para o segundo diagrama de Venn-Euller. Esta segunda análise foi elaborada para excluir UTOs que ocorreram esporadicamente em uma única amostra. Deste modo, este conjunto de dados de maior rigor revelou as UTOs que são estáveis e ocorreram nas esponjas de uma maneira independente da fase de vida do hospedeiro.

Análise de agrupamento esponja-específico foi realizado por meio do alinhamento de sequências geradas neste estudo com sequências próximas depositadas no GenBank (NCBI), seguido por reconstrução filogenética usando o algoritmo *neighbour-joining*.

4.2.6 Análise funcional de comunidades bacterianas a partir de dados do gene 16S rRNA

A ferramenta PICRUST (LANGILLE et al., 2013) foi utilizada para predição do metagenoma funcional de cada amostra. PICRUST é uma ferramenta de bioinformática que utiliza marcadores genéticos, no caso o gene 16S rRNA para predição do conteúdo funcional de genes no metagenoma.

Isto foi feito agrupando-se as UTOs contra um arquivo Greengenes, versão gg_13_5_otus, em 97% de similaridade de sequência usando o *script* pick_closed_reference_otus.py no QIIME. A tabela de UTOs gerada, foi normalizada quanto ao número de cópias do gene 16S rRNA, usando o terminal Galaxy online (<http://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/>) e predições funcionais do metagenoma foram criados.

O arquivo gerado após PICRUST consistiu de uma tabela de contagens funcionais, ex. número de vias KEGG por amostra. Desde que ortólogos KEGG (KOs) podem pertencer a diversas vias funcionais, o *script* categorize_by_function.py foi utilizado no Galaxy para juntar predições Picrust em nível de vias individuais. Esta tabela final foi baixada do terminal Galaxy e depois analisada usando o software *Statistical Analysis of Metagenomic Profiles* (STAMP) para testar significantes diferenças funcionais preditas nas comunidades bacterianas entre os dois conjuntos de dados (esponjas vs. água do mar).

Número de acesso de sequências de nucleotídeos

Sequências bacterianas do gene 16S rRNA obtidas neste estudo encontram-se publicamente disponíveis no servidor MG-RAST sob números de acesso 4696821.3 até 4696836.3. Sequências CO1 de esponjas foram depositadas no GenBank sob números de acesso KX034567 até KX034578.

4.3 Resultados

4.3.1 Identificação e relações filogenéticas das esponjas

A abordagem integrando dados morfológicos e sequenciamento do gene mitocondrial confirmou a identidade dos espécimes como pertencentes para as famílias Aplysinidae: *Aplysina fulva* (Pallas 1766) e *Aiolochoira crassa* (Hyatt, 1875), e Chondrosidae: *Chondrosia collectrix* (Schmidt, 1870), todas incluídas na subclasse Verongimorpha. Não foi observada variação intra-específica entre sequências mtCO1 das três espécies estudadas. Além do mais, a reconstrução filogenética aqui apresentada, (Figura 4) foi consistente com a hipótese filogenética atual de Demosponges (ERPENBECK et al. 2012; MORROW & CÁRDENAS 2015).

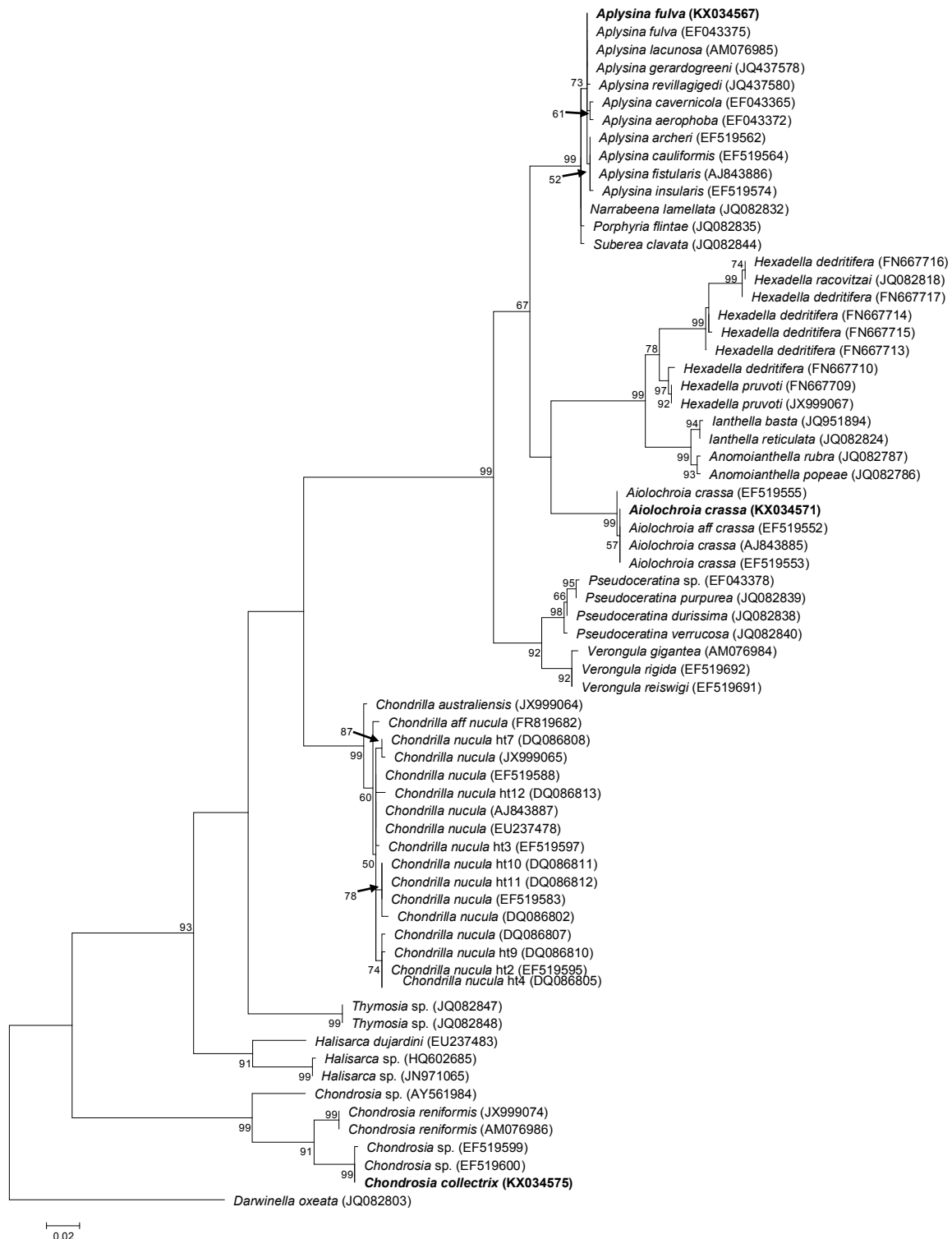


Figura 4 - Árvore máxima verossimilhança mostrando as relações filogenéticas de sequências do fragmento do gene CO1 a partir de esponjas da subclasse Verongimorpha. Sequências geradas neste estudo são destacadas em negrito. Um total de 550 posições foram consideradas para a reconstrução filogenética. A esponja Keratosa *Darwinella oxeata* (Bergquist, 1961) foi usada como grupo externo

4.3.2 Composição da comunidade bacteriana baseada em análises de sequências do gene 16S rRNA

As classificações taxonômicas foram resumidas em níveis de filo e classe (Figura 5). As UTOs foram classificadas para 20 filios bacterianos em *A. fulva*, 19 em *A. crassa*, 13 em *C. collectrix* e 15 na água do mar. A média dos valores, considerando todas as réplicas, revelou que Actinobacteria, Acidobacteria, Chloroflexi, Proteobacteria e Gemmatimonadetes foram os mais abundantes filios na comunidade de esponjas (>1% de abundância relativa das leituras). Os candidatos a filo Poribacteria e PAUC34f foram particularmente enriquecidos em *A. fulva* e o filo Bacteroidetes foi enriquecido em *C. collectrix*. Enquanto que mais de 95% das sequências bacterianas de amostras da água do mar foram classificadas em dois filios dominantes: Proteobacteria (87%) e Bacteroidetes (8%).

Quando as comunidades bacterianas foram examinadas em níveis taxonômicos mais profundos, 63 classes e 115 ordens foram observadas para todo o conjunto de dados. O filo Actinobacteria foi abundante em amostras de esponjas e classificados na ordem Acidimicrobiales sendo preferencialmente enriquecidos em *A. crassa*. As bactérias verdes não sulfurosas, Chloroflexi e Acidobacteria variaram em abundância entre as três espécies de esponjas. As classes dentro desses filios também variaram entre as esponjas, com Anaerolineae (Chloroflexi) mais abundante em *A. fulva* e *C. collectrix* do que em *A. crassa*. Outro grupo notável em esponjas foi Gammaproteobacteria (Proteobacteria), o qual também foi altamente representado em amostras da água do mar (64%). Em contraste, as bactérias púrpura sulfurosas (ordem: Chromatiales) dentro do filo Proteobacteria foram mais abundantes em esponjas do que em amostras de água do mar.

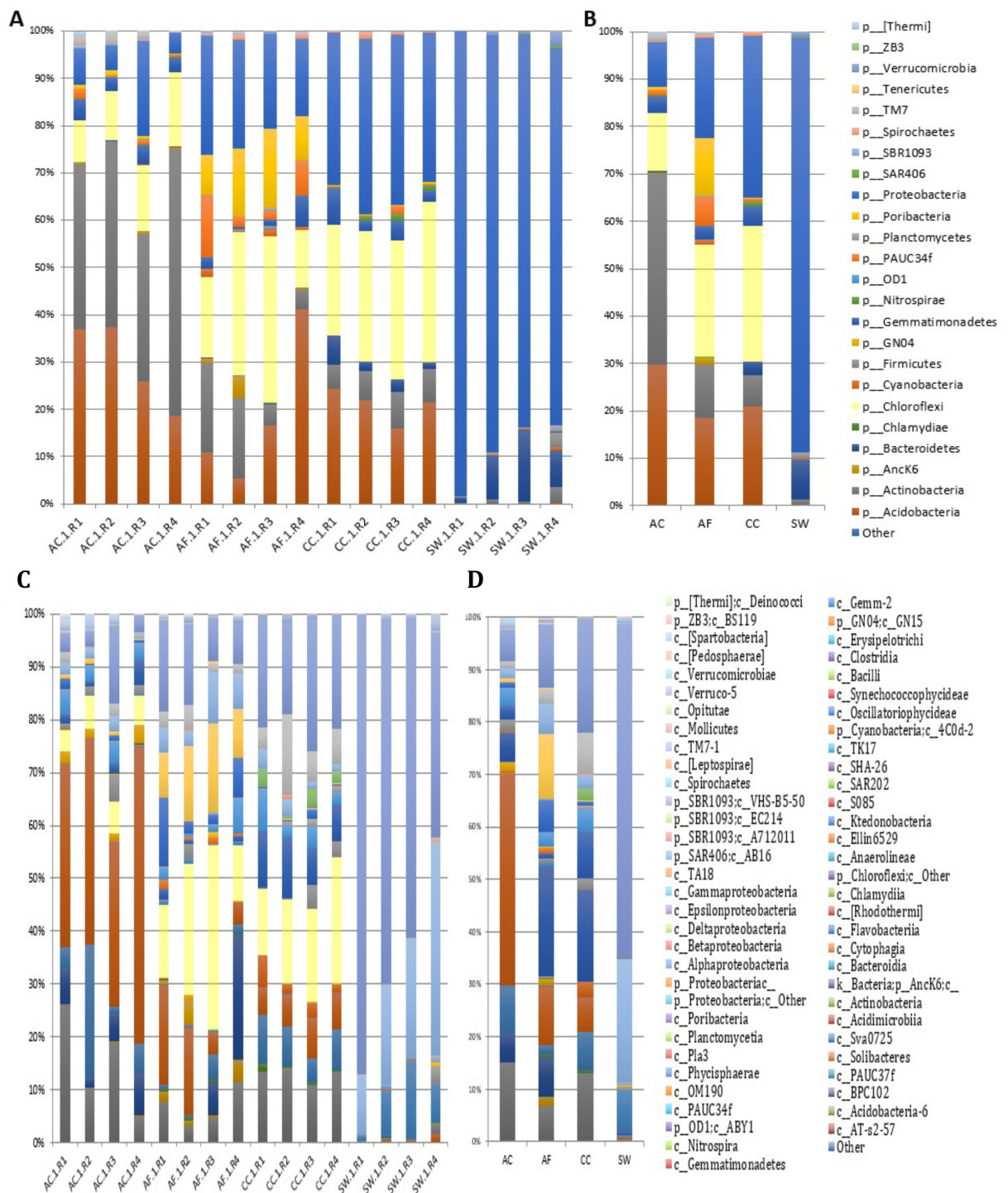


Figura 5 - Classificações taxonômicas nos níveis de Filo (A e B) e Classe (C e D) mostrando a abundância relativa (%) de sequências do gene de 16S rRNA das esponjas *A. crassa* (AC), *A. fulva* (AF), *C. collectrix* (CC) e amostras da água do mar (SW). O gráfico de barras representa a contribuição de grupos bacterianos para cada réplica (n=4) (A e C) e para a média de cada tratamento (B e D)

4.3.3 Relações entre a filogenia do hospedeiro e comunidades bacterianas

Para avaliar o efeito da filogenia do hospedeiro na composição de comunidades bacterianas de esponjas Aplysinidae, foi testado se a comunidade bacteriana de esponjas que ocorrem no mesmo sítio de coleta, *A. crassa* e *A. fulva*, compartilham mais filotipos entre elas, do que com *C. collectrix* (colocado como o táxon mais próximo para Aplysinidae neste estudo), e se essas comunidades são distintas das comunidades encontradas na água do mar.

Os conjuntos de dados foram analisados usando distâncias *unweighted* UniFrac e Bray-Curtis e agrupados por PCoA. Os resultados indicaram que as três espécies de esponjas abrigaram distintas comunidades bacterianas a partir daquelas encontradas na coluna d'água e cada esponja reteve uma composição bacteriana que diferiu de cada outra (PERMANOVA, $F=6,0035$, $P=0,0001$; ANOSIM, $R=0,9991$, $P=0,0001$). Contudo, mais similar comunidades bacterianas nas esponjas da família Aplysinidae (PERMANOVA, $F=3,3881$, $P=0,0291$; ANOSIM, $R=1$, $P=0,0294$) foram claramente observadas quando comparado para seu parente mais próximo Chondrosidae (Figura 6).

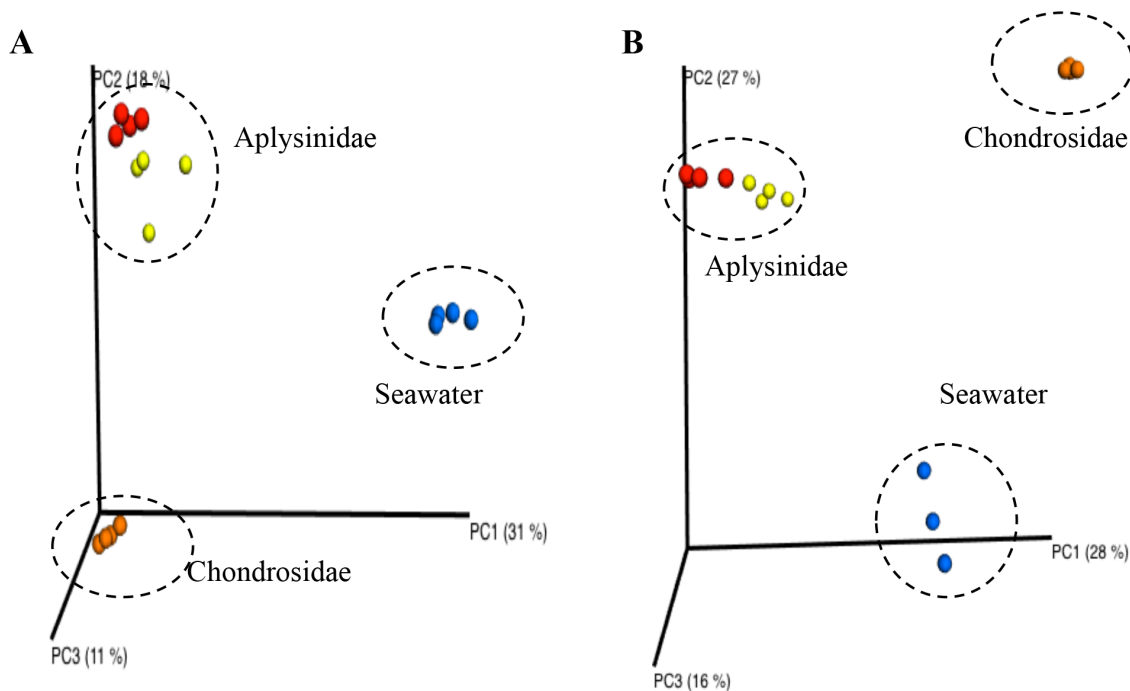


Figura 6 - Análises de Coordenadas Principais (PCoA) de comunidades bacterianas de esponjas e água do mar em 97% de similaridade, baseado em agrupamento UCLUST usando distâncias (A) Bray-Curtis e (B) *unweighted* UniFrac. Em ambos os casos, há três principais grupos: um composto por amostras da água do mar (pontos em azul) e dois grupos correspondendo para as famílias Aplysiniidae, composto por *A. crassa* e *A. fulva* (pontos em vermelho e amarelo, respectivamente) e Chondrosidae, composto por *C. collectrix* (pontos em laranja)

4.3.4 Mais UTOs são compartilhadas entre esponjas do mesmo grupo taxonômico

Para todas as 2.112 UTOs presentes neste conjunto de dados, 1.259 UTOs (59,6%) foram estritamente associadas com esponjas e 745 UTOs (35,3%) foram exclusivas da água do mar. Um total de 108 UTOs (5,1%) foram compartilhadas entre esponjas e água do mar (Figura 7a). Notavelmente, hospedeiros Aplysiniidae compartilharam mais UTOs do que amostras de *C. collectrix* e água do mar.

Um segundo diagrama de Venn foi construído para detectar UTOs que foram presentes simultaneamente em todas as quatro réplicas por esponja (excluindo

aquelas UTOs detectadas em quaisquer amostras da água do mar). Este novo conjunto de dados continha 130 UTOs e exibiu uma alta especificidade para cada esponja, com 54, 25 e 20 UTOs em *C. collectrix*, *A. crassa* e *A. fulva*, respectivamente (Figura 7b). Surpreendentemente, apenas 5 UTOs (8,7% de um total de 63.971 leituras do gene de 16S rRNA de esponjas) foram compartilhadas entre todas as esponjas. As classificações taxonômicas para estas 5 UTOs revelaram membros generalistas, tais como, Gemmatimonadetes, Proteobacteria (Gammaproteobacteria), Acidobacteria, Actinobacteria (Acidimicrobiia) e candidato PAUC34f. Além disso, uma grande fração de UTOs foram parte de uma comunidade variável, que é ocasionalmente encontrada em espécimes individuais e, portanto, não fazem parte de uma microbiota estável. Neste sentido, consideramos que UTOs espécie-específicas foram as principais responsáveis pela dissimilaridade entre as comunidades bacterianas associadas com diferentes esponjas. Ao mesmo tempo, foi observado que hospedeiros Aplousinidae selecionaram do ambiente 8 UTOs como parte de uma microbiota estável e abundante.

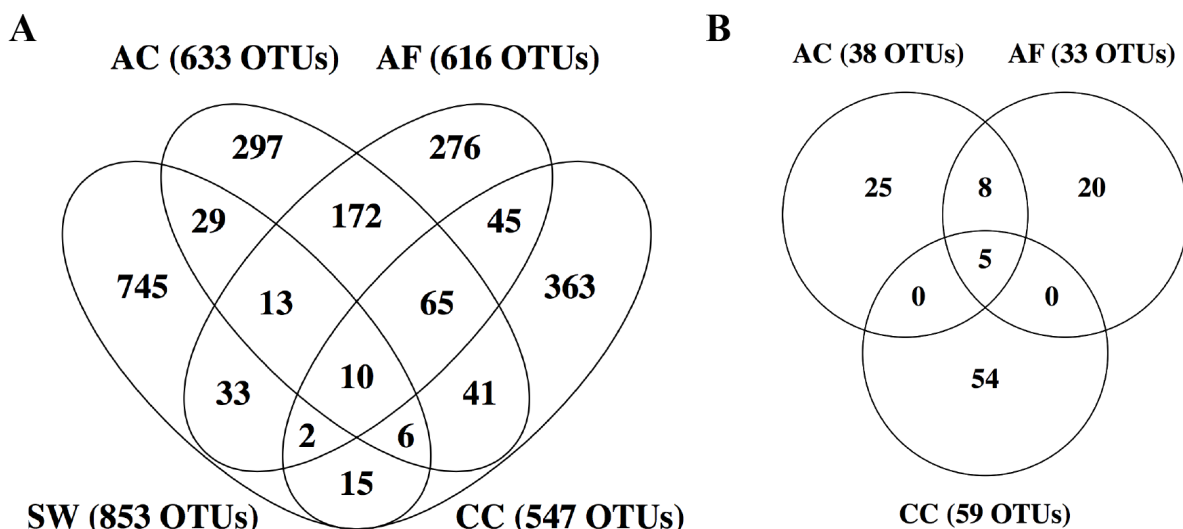


Figura 7 - **A)** Diagrama de Venn mostrando o número de UTOs compartilhadas e exclusivas de um total de 2.112 UTOs para as esponjas *A. crassa* (AC), *A. fulva* (AF), *C. collectrix* (CC) e amostras da água do mar (SW). Sessenta e cinco UTOs foram compartilhadas entre todas as três esponjas e apenas 10 UTOs foram encontradas em todas as amostras. AC e AF pertencem a mesma família e compartilham mais UTOs (172) do que as outras duas comparações ((AC x CC = 41) and (AF x CC = 45)). **B)** Diagrama de Venn mostrando o número de UTOs estáveis e exclusivas de um total de 130 UTOs. Observe que apenas 5 UTOs são compartilhadas entre todas as três espécies e 8 UTOs são compartilhadas entre *A. crassa* e *A. fulva*. Enquanto que *C. collectrix* não compartilhou nenhuma UTO com as outras duas esponjas

Análise filogenética de UTOs com outras sequências retiradas do GenBank revelou agrupamento com sequências bacterianas obtidas de outras esponjas (Figura 8), corais, sedimento e água do mar (Figura 9). Este fato demonstra a natureza generalista das comunidades bacterianas associadas à esponjas. Ao mesmo tempo, revela associações bacterianas estáveis habitando às esponjas hospedeiras.

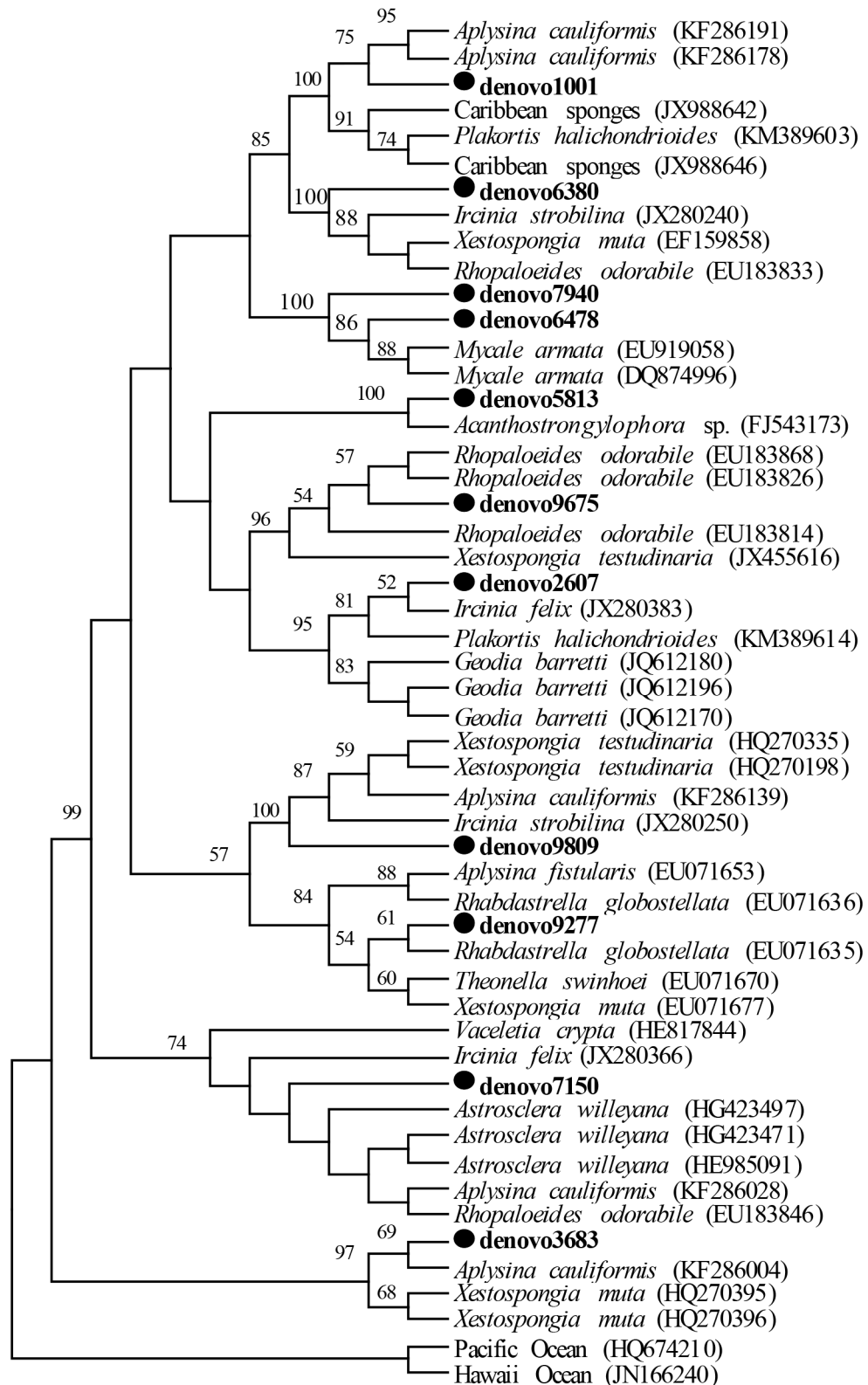


Figura 8 - Árvore filogenética mostrando relações esponja-específicas para 11 UTOs (destacadas em negrito) e sequências de outras esponjas marinhas retiradas do GenBank. Amostras do Oceano foram usadas como grupo externo

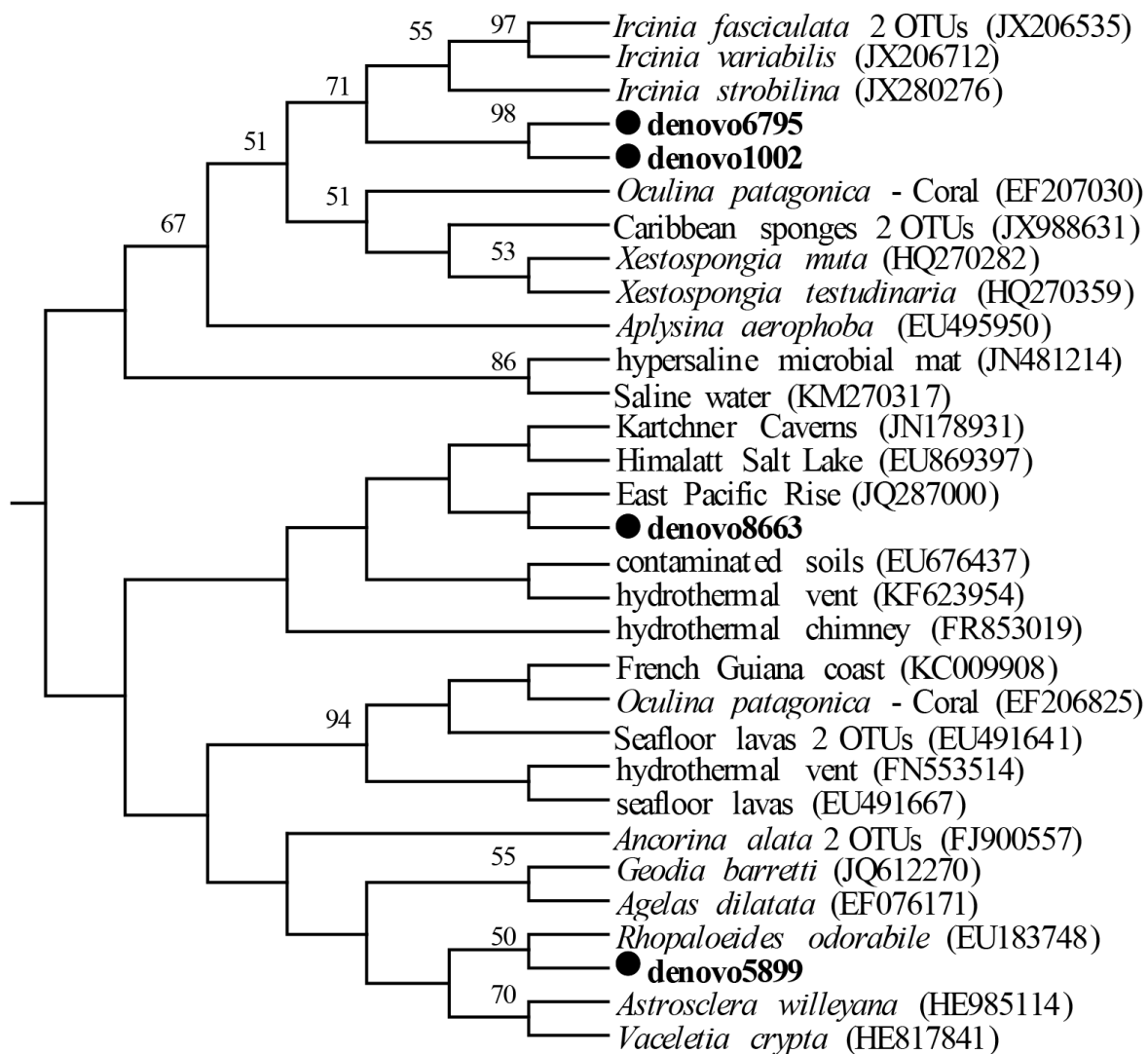


Figura 9 - Sub-árvore a partir de uma grande reconstrução filogenética mostrando relações entre 4 OTUs (destacadas em negrito) com outras sequências relacionadas a amostras ambientais (coral, sedimento e água do mar) retiradas do GenBank

Nesse sentido, duas UTOs relacionadas para Gammaproteobacteria e *Synechococcus* detectadas em *A. fulva* neste estudo, foram fortemente associadas com um agrupamento contendo sequências detectadas em *A. fulva* coletada na costa Brasileira e outra espécie de esponja co-genérica da costa Caribenha (Figura 10).

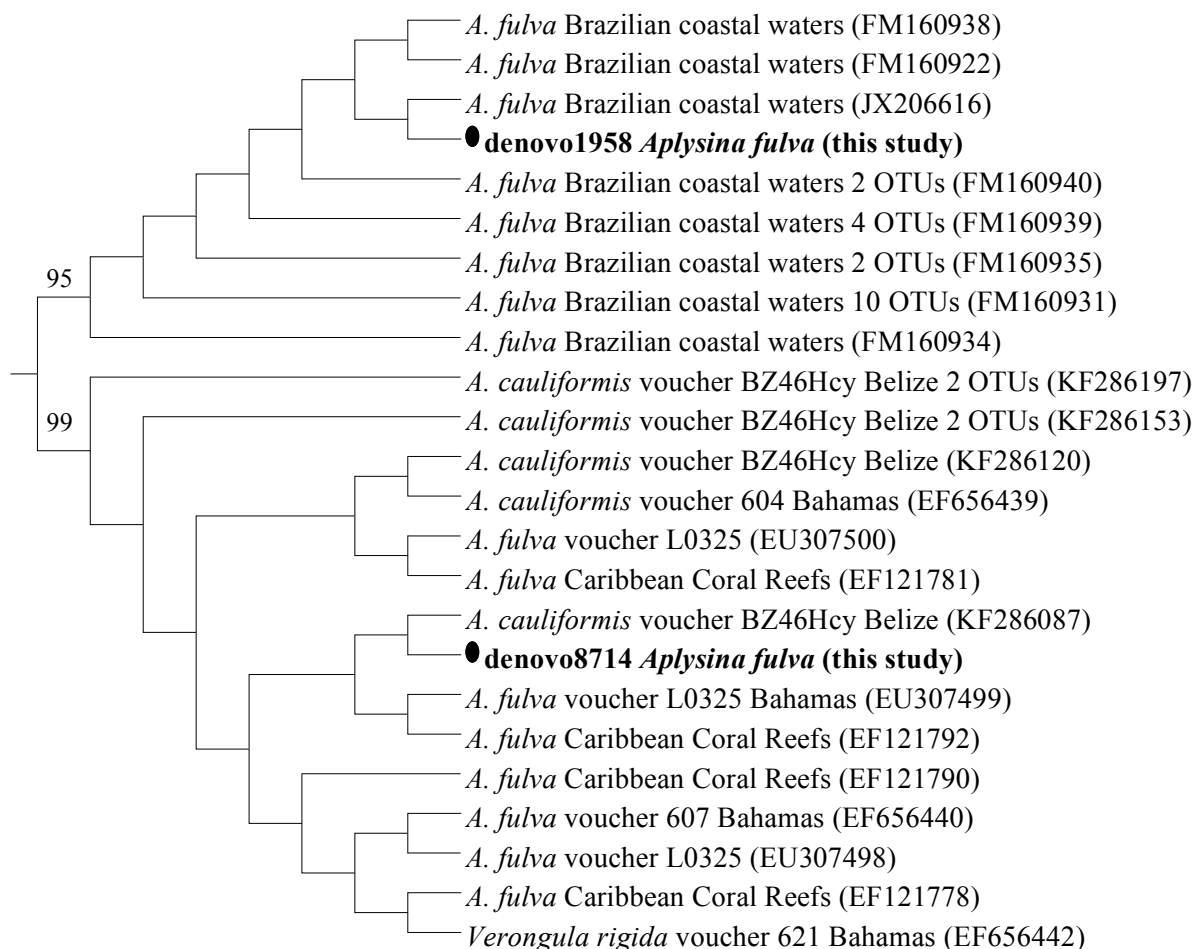


Figura 10 - Sub-árvore a partir de uma grande reconstrução filogenética mostrando agrupamentos *Aplysina*-específico de duas UTOs (denovo1958 e denovo 8714) relacionadas para Gammaproteobacteria e *Synechococcus* recuperados de *Aplysina fulva* neste estudo. Um agrupamento contém sequências detectadas na mesma espécie de esponja coletada na costa Brasileira. O segundo agrupamento contém outra espécie de esponja co-genérica coletada na costa do Caribe

4.3.5 Inferência funcional em esponjas e água do mar

Para resumir algumas das potenciais contribuições funcionais do conjunto de dados obtidos para esponjas e água do mar, os perfis funcionais foram obtidos a 97% de similaridade usando a ferramenta PICRUST. Esta abordagem usa modelagem evolucionária para dar ligações ao conteúdo genético de organismos ambientais baseado em genomas previamente sequenciados. A precisão deste método é alta, quando genomas de referência intimamente relacionados são

disponíveis. Esta precisão pode ser quantificada usando o score NSTI (por favor, ver LANGILLE et al., 2013 para mais detalhes) Desse modo, suficientes genomas de referência foram disponíveis para amostras de água do mar (NSTI 0,1085), enquanto dados genômicos disponíveis para comunidades de esponjas mostrou baixa acurácia (NSTI 0,2865).

Baseado na inferência funcional, foi observado uma clara diferença na composição de ortólogos KEGG (KO) entre esponjas e água do mar, o qual deve indicar diferentes estratégias metabólicas (Figura 11).

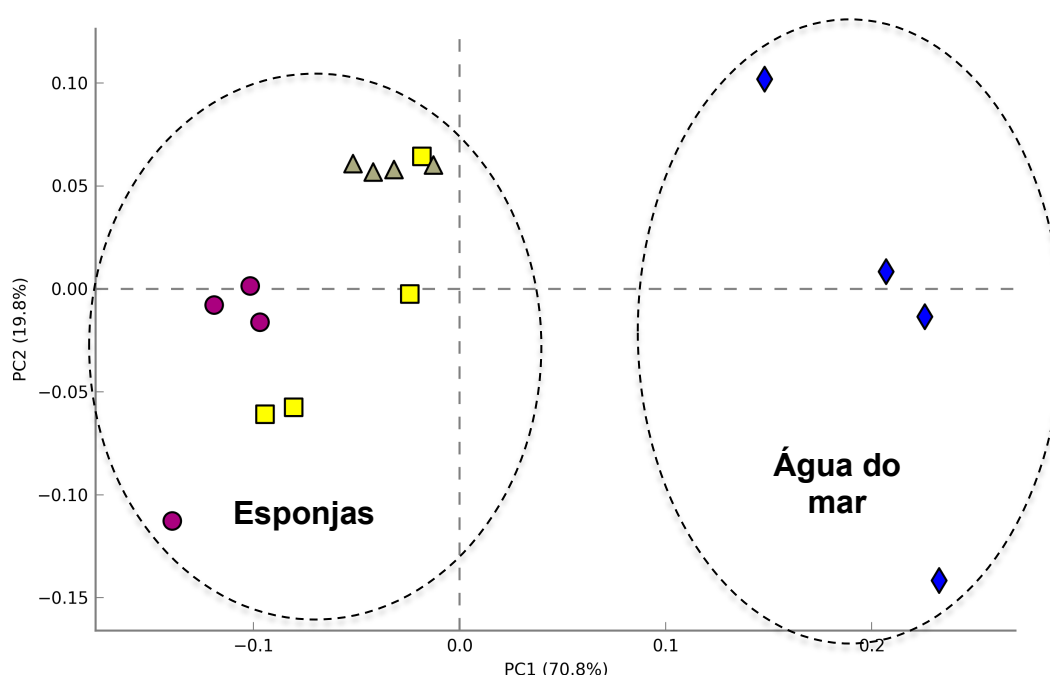


Figura 11 - Análise de Coordenadas Principais (PCA) de dados de ortólogos KEGG indicando diferentes estratégias metabólicas entre esponjas e água do mar. (AF) é representado em quadrados amarelo; (AC) círculos em vermelho; (CC) triângulos em cinza e (SW) losangos em azul. O software STAMP foi utilizado para aplicar a estatística ANOVA com teste *post-hoc* Tukey-Kramer corrigido por Benjamini-Hochberg

No nível superior da organização de categorias funcionais, a categoria relacionada a doenças humanas foi enriquecida em água do mar e a categoria de sistemas de organismos foi enriquecida em esponjas. A nível de subcategoria

funcional, água do mar foi significativamente enriquecida em processos celulares e via do metabolismo de aminoácidos. Por outro lado, vias relacionadas à comunicação celular, adaptação ao ambiente e metabolismo de açúcares (ex. moléculas sinalizadoras e interação, biossíntese de metabólitos secundários e metabolismo de carboidratos) foram enriquecidas em esponjas marinhas (Figura 12).

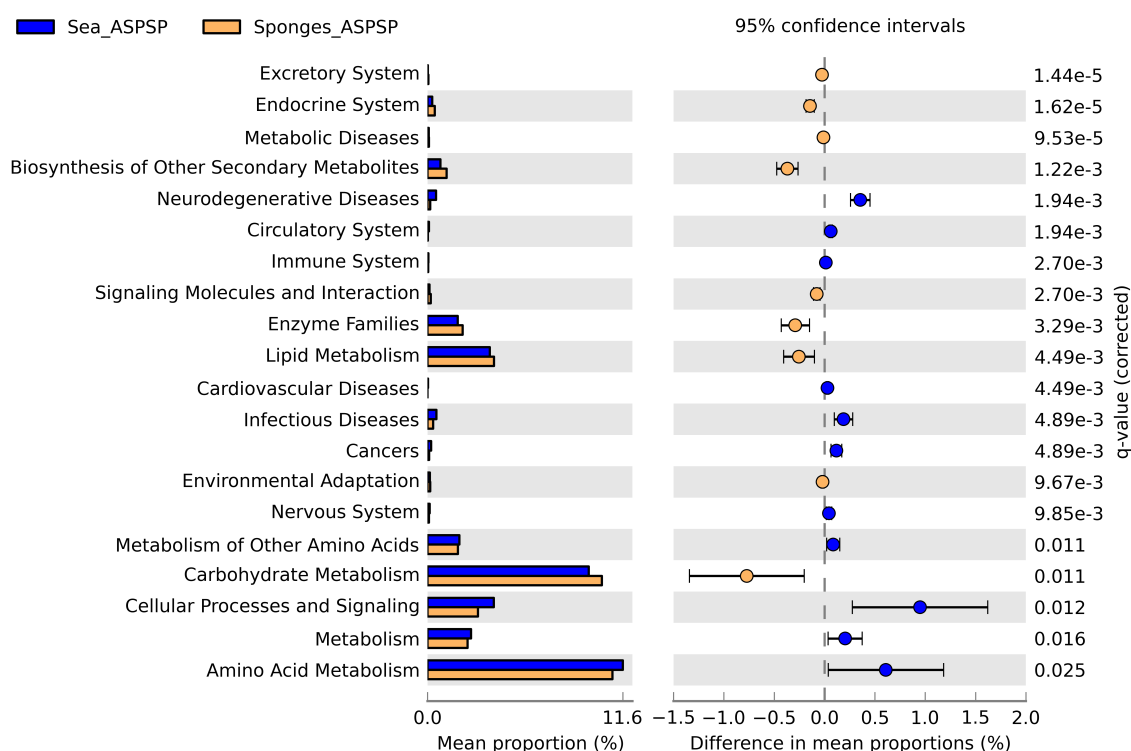


Figura 12 - Diferenças nas médias proporcionais de metagenomas preditos a partir de esponjas e água do mar. O software STAMP foi usado para construção da figura

4.4 Discussão

Neste estudo, UTOs dominantes foram classificadas como Acidimicrobiia (Actinobacteria), Acidobacteria grupo 6, Anaerolineae (Chloroflexi) e Chromatiales (Gammaproteobacteria). Hardoim e Costa (2014) também identificaram Acidimicrobiia como um grupo estável e abundante em *Sarcotragus spinosulus*. O clado Acidimicrobiia marinho compreende bactérias fotoheterotróficas com estilo de vida planctônico que são bem adaptados às águas marinhas (MIZUNO et al., 2015). Para nosso conhecimento, Acidobacteria e Chloroflexi são os mais comuns filos

bacterianos em esponjas de alta abundância microbiana (AAM), pertencendo a muitas diferentes linhagens filogenéticas (SCHMITT et al., 2011;. GILES et al., 2013; O'CONNOR-SÁNCHEZ et al., 2014; BAYER et al., 2014). Os membros desses grupos são fototróficos anoxigênicos exibindo uma extensa versatilidade metabólica (BRYANT et al., 2012). As bactérias púrpuras do enxofre dentro da ordem Chromatiales abrangem espécies microaerofílicas ou anaeróbias capazes de realizar a fotossíntese anoxigênica (IMHOFF, 2005).

Em geral, os filos identificados neste estudo foram semelhantes àqueles observados em trabalhos anteriores de comunidades bacterianas associadas com esponjas (WEBSTER et al., 2013a; CLEARY et al., 2013, 2015; NAIM et al., 2014;. BAYER et al., 2014; VOOGD et al., 2015). No entanto, foram observadas algumas alterações na estrutura da comunidade que, por sua vez, podem estar relacionadas com as estratégias de sequenciamento e filtragem dos dados adotados por outros autores.

Ainda que os filos Cyanobacteria e Bacteroidetes foram classificados como menores grupos em nossa abordagem de sequenciamento, uma alta abundância de UTOs relacionados a estes grupos foram detectados em *A. fulva* usando uma biblioteca de clones de sequências do gene 16S rRNA (HARDOIM et al., 2009). Embora o candidato a filo Poribacteria foi encontrado em todas as espécies de esponjas examinadas no presente estudo, nenhuma UTO foi detectada no microbioma de *A. fulva* e *A. crassa* usando o banco de dados SILVA e RDP (EASSON; THACKER, 2014; O'CONNOR-SÁNCHEZ et al., 2014). O candidato a filo Poribacteria foi detectado pela primeira vez em esponjas marinhas (FIESELER et al., 2004) e, desde então, tem sido encontrado entre muitas diferentes espécies de esponjas, incluindo membros da família Aplysinidae (LAFI et al., 2009). Mais recentemente, abordagens genômicas para uma única célula revelaram diversas estratégias metabólicas e adaptações simbióticas em Poribacteria associadas com *Aplysina aerophoba* (SIEGL et al., 2011;. KAMKE et al., 2013, 2014). Estes mesmos autores propuseram que Poribacteria estão bem adaptadas ao ambiente esponja.

De modo geral, o domínio desses grupos em esponjas pode indicar um papel específico para a biologia do animal. Apesar destes grupos serem encontrados em esponjas de (AAM) de diversos habitats, incluindo ambientes tropicais e temperados (SCHMITT et al., 2011; CLEARY et al., 2013; CÁRDENAS et al., 2014; KENNEDY et

al., 2014), até o momento poucos representantes cultivados foram isolados (BRÜCK et al., 2010).

Neste estudo, a identificação molecular das espécies de esponjas permitiu uma interpretação robusta dos resultados considerando a taxonomia do hospedeiro e suas comunidades bacterianas associadas. Muitos estudos têm demonstrado que diferentes espécies de esponjas encontradas no mesmo habitat abrigam comunidades bacterianas distintas (HARDOIM et al., 2012; WEBSTER et al., 2013a; CLEARY et al., 2013; NAIM et al., 2014). Consistente com esse pressuposto, os perfis das comunidades bacterianas nas três espécies de esponjas avaliadas foram diferentes e se diferenciaram daquelas comunidades encontradas na água do mar. Contudo, esta dissimilaridade foi menor quando membros do mesmo grupo filogenético foram considerados (Figura 6). De fato, quando considerado hospedeiros do mesmo grupo taxonômico e filogenético é observado uma tendência em exibir comunidades microbianas mais similares (EASSON & THACKER, 2014). Esta observação também foi encontrada em outros hospedeiros eucarióticos que suportam um complexo consórcio bacteriano (animais e plantas) (OCHMAN et al., 2010; MOELLER et al., 2013; BOUFFAUD et al., 2012). Recentemente, Bouffaud et al. (2014) investigaram o microbioma da rizosfera de diversos genótipos de milho e outras Poaceae e os resultados indicaram que a história evolutiva do hospedeiro pode ser um fator significativo na modulação da composição da comunidade microbiana.

No entanto, até o momento, não há um consenso se o conhecimento filogenético do hospedeiro irá de certa forma influenciar a composição da comunidade microbiana em esponjas. Esta relação não foi encontrada por Schmitt et al. (2012), onde estudaram a composição bacteriana em 32 espécies de esponjas coletadas em diferentes oceanos. Contudo, não podemos excluir que as observações feitas por Schmitt et al. (2012) sofreram influências biogeográficas ao analisar o microbioma de esponjas amostradas em distintas localizações. Assim, Hardoim et al. (2012) investigaram a composição microbiana em esponjas filogeneticamente e espacialmente próximas, utilizando PCR-DGGE, e verificaram uma composição microbiana altamente divergente. Estes autores concluíram que cada espécie de esponja recruta uma comunidade bacteriana específica. Em contraste a este estudo, não podemos deixar de mencionar que no trabalho

realizado por Hardoim et al. (2012) faltou uma terceira espécie de esponja mais distantemente relacionada para responder com maior segurança essa questão.

Neste estudo, os resultados mostraram que as comunidades bacterianas foram claramente afetadas pela filogenia das espécies de esponjas. Esponjas Aplousinidae apresentaram menor dissimilaridade em suas comunidades bacterianas do que aquelas em Chondrosidae (Figura 6). Schöttner et al. (2013) também observaram uma relação positiva entre a dissimilaridade da comunidade bacteriana e a distância filogenética da família Geodiidae (Porifera: Heteroscleromorpha). Estas observações indicaram que hospedeiros filogeneticamente relacionados possuem comunidades bacterianas mais semelhantes do que os parentes mais distantes. Em contraste com esta observação, o estudo realizado por Reveillaud et al. (2014) revelou que apesar de uma aparente especificidade e estabilidade de simbiontes em esponjas amostradas em diferentes regiões e escalas batimétricas, espécies muito próximas de *Hexadella* (Verongiida; Ianthellidae), mais especificamente *H. pruvoti* e *H. cf. dedritifera*, não mantiveram um elevado grau de semelhança entre as suas comunidades bacterianas. Embora não diretamente testado, esta tendência inversa pode estar relacionada a fatores biogeográficos, que fortemente afetam muitos aspectos da biologia de esponjas. Consequentemente, tem sido sugerido que a transmissão horizontal, devido à aquisição de bactérias do ambiente circundante, deve ser considerado um mecanismo válido que molda as comunidades bacterianas.

Montalvo e Hill (2011) detectaram uma comunidade bacteriana similar associada com duas espécies filogeneticamente próximas do gênero *Xetospongia* (*X. muta* e *X. testudinaria*) que habitam os oceanos Atlântico e Pacífico, respectivamente. Estes autores concluíram que a especiação bacteriana ocorreu dentro do hospedeiro esponja e refletiu a sua transmissão vertical através do tempo evolutivo. Adicionalmente, a transmissão vertical de comunidades bacterianas de esponjas adultas para larvas já foi sugerida para muitas espécies de esponjas, incluindo esponjas da subclasse Verongimorpha, o que potencialmente é indicativo de co-evolução esponja-bactéria (GALLISSIAN; VACELET, 1976; LÉVI; LÉVI, 1976).

Dessa forma, tanto aspectos verticais (parental) e horizontais (ambientais) devem ser levados em conta para se obter uma melhor interpretação da estrutura bacteriana, tal como foi recentemente sugerido para outras diferentes espécies de esponjas (SIPKEMA et al., 2015).

A amostragem de quatro repetições de cada esponja possibilitou a análise de membros “core” das comunidades bacterianas associadas para estes animais. Dessa forma, foi possível distinguir grupos bacterianos estáveis de transitórios. Nossos resultados revelaram uma grande fração de UTOs que foram classificadas como transitórias. Estas UTOs esporádicas compartilharam alguma relação filogenética com sequências detectadas na água do mar e outros invertebrados marinhos (dados não mostrados). Estes grupos bacterianos recuperados dos tecidos da esponja podem representar uma fonte de alimento ou bactérias ambientais presentes nos canais da esponja no momento da amostragem, sem quaisquer implicações para a saúde da esponja (REISWIG, 1975; WEBSTER et al., 2010; HENTSCHEL et al., 2012). Em contraste, bactérias abundantes comuns a todas as amostras de um dado habitat, podem ser essenciais para uma função específica em uma comunidade. Assim, a identificação de um microbioma estável em associação complexa com esponjas pode melhorar a nossa compreensão dos papéis que estes microrganismos realizam em seus hospedeiros.

Apenas cinco UTOs foram compartilhadas entre todas as espécies de esponjas investigadas (Figura 7b), revelando que cada esponja abrigou uma comunidade bacteriana única. Contudo, nosso estudo também detectou oito UTOs estáveis e abundantes compartilhadas entre *A. crassa* e *A. fulva*, ao passo que nenhuma destas UTOs foram compartilhadas com o parente mais próximo *C. collectrix*. Este resultado revela uma potencial seleção exercida pela história evolutiva do hospedeiro sob bactérias da água do mar. De fato, tal relação deve envolver co-evolução, mas permanece de forma especulativa. Além disso, se estas UTOs são especialmente enriquecidas em hospedeiros Aplousinidae, a associação simbiótica deve ser mantida estritamente via transmissão vertical através de um tempo evolutivo.

Considerando as UTOs específicas, as três espécies de esponjas abrigaram noventa e nove UTOs (54, 25 e 20 em *C. collectrix*, *A. crassa* e *A. fulva*, respectivamente). A relação destas UTOs com outras sequências disponíveis no banco de dados mostrou três padrões de agrupamento em termos de sua afiliação com sequências detectadas a partir das seguintes fontes: (i) UTOs Aplousina-específica; (ii) UTOs de diferentes espécies de esponjas; e (iii) sequências relacionadas com diversas amostras ambientais (água do mar e sedimento).

Curiosamente, duas UTOs relacionadas à Gammaproteobacteria e *Synechococcus spongiarum* detectadas em *A. fulva* (Figura 10) foram fortemente associadas a um agrupamento contendo sequências previamente detectadas na mesma espécie de esponja e co-genérica coletadas na costa Brasileira e Caribenha, respectivamente. Este agrupamento bem estabelecido sugere uma associação estável entre esponja e bactérias dentro de *Aplysina* spp. e muitas vezes está relacionada ao estado de saúde do hospedeiro (ERWIN, THACKER, 2008;. OLSON et al., 2014). Adicionalmente, *S. spongiarum* foi encontrada em pelo menos quarenta espécies de esponjas e representa o maior grupo específico de esponjas até o momento (SIMISTER et al., 2012b). A transmissão vertical de *S. spongiarum* de pais para filhos já foi relatado para outras esponjas (USHER et al., 2005;. OREN et al., 2005). Recentemente, o genoma desta cianobactéria foi sequenciado e os autores concluíram que esta interação simbiótica causou perdas de genes envolvidos em várias funções não essenciais culminando na redução do genoma da cianobactéria (GAO et al., 2014; BURGSDORF et al., 2015).

Embora só recentemente aplicada em estudos ecológicos, a ferramenta PICRUSt já foi usada para inferir perfis funcionais de comunidades bacterianas complexas, tais como intestino, solo, sedimentos e animais marinhos, incluindo corais e esponjas (STALEY et al., 2014; CLEARY et al., 2015; WAITE; TAYLOR, 2014; KUMBHARE et al., 2015; MORROW 2015; THOMPSON et al., 2015; TZENG et al., 2015; VOOGD et al., 2015; POLÓNIA et al., 2015). No entanto, a precisão dessas inferências em animais marinhos exige mais cautela, pois estes ambientes abrigam estruturalmente e funcionalmente diversos microrganismos ainda não descritos (CLEARY et al., 2015).

No presente estudo, a dissimilaridade das comunidades bacterianas observadas entre as esponjas e água do mar, também se refletiu quando aspectos funcionais de suas comunidades foram considerados. Em geral, uma grande variedade de genes que codificam para os processos essenciais e funcionais foram diferencialmente detectados, tais como aqueles de interações com o ambiente e sinalização, metabolismo de carboidratos e proteínas, e síntese de metabolitos secundários. Voogd et al. (2015) empregaram PICRUSt e incidiram sobre os aspectos funcionais de duas esponjas (*Stylissa massa* e *Xetospongia testudinaria*) focando, principalmente, no metabolismo do nitrogênio. Estes autores encontraram comunidades bacterianas distintas e pronunciadas diferenças de KOs entre as

esponjas estudadas. Por outro lado, os mesmos autores também evidenciaram papéis funcionais semelhantes relacionados com o ciclo do nitrogênio, o que sugere a existência de uma redundância funcional exercida por suas comunidades bacterianas. Fan et al. (2012), utilizando sequenciamento “shotgun”, também verificaram uma série de características funcionais que distinguem as comunidades associadas às esponja das comunidades microbianas na água do mar.

Em geral, as inferências funcionais de PICRUST têm sido significativamente correlacionadas com dados de sequenciamento “shotgun” do Projeto Microbioma Humano, bem como de solos, mantos microbianos hipersalinos e rúmen de ovinos (LANGILLE et al., 2013; LOPES et al., 2015). De certa forma, os mecanismos funcionais detectados especificamente nas esponjas podem ter papéis ecológicos importantes na saúde do hospedeiro, fornecendo mecanismos de defesa e moldando a comunidade bacteriana associada, através de moléculas de sinalização e atividade antimicrobiana.

Em conclusão, menor dissimilaridade nas comunidades bacterianas foi observada claramente dentro de espécies *Aplysinidae* quando comparado com o seu parente mais próximo *Chondrosidae*. Isso nos leva a concluir que as comunidades bacterianas podem ser moldadas pela história evolutiva do hospedeiro. No entanto, outros aspectos também podem estar envolvidos na aquisição de propágulos bacterianos das diferentes fontes do ambiente. Adicionalmente, é necessário aqui destacar que esta menor dissimilaridade encontrada em hospedeiros filogeneticamente relacionados, não necessariamente implica que simbioses têm co-evoluído com seus hospedeiros. Certamente, mais investigações são necessárias para explorar totalmente a extensão de co-evolução em esponjas utilizando uma abordagem integrando múltiplos grupos de espécies de esponjas “intimamente” relacionadas, comparadas com grupos externos filogeneticamente apropriados. Ainda, este estudo sugere que a proximidade filogenética e espacial dos hospedeiros, expressada por características anatômicas e fisiológicas em comuns (genótipo e fenótipo), podem agir como forças seletivas para explicar os perfis filogenéticos do consórcio bacteriano.

Referências

BAYER, K.; KAMKE, J.; HENTSCHEL, U. Quantification of bacterial and archaeal symbionts in high and low microbial abundance sponges using real-time PCR. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 89, n. 3, p. 679–690, 2014.

BOUFFAUD, M.L.; POIRIER, M.A.; MULLER, D.; MOËNNE-LOCCOZ, Y. Root microbiome relates to plant host evolution in maize and other Poaceae. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 16, n. 9, p. 2804-2814, 2014.

BOUFFAUD, M.L.; KYSELKOVÁ, M.; GOUESNARD, B.; GRUNDMANN, G.; MULLER, D.; MOËNNE-LOCCOZ, Y. Is diversification history of maize influencing selection of soil bacteria by roots? **Molecular Ecology**, Oxford, v. 21, n. 1, p. 195-206, 2012.

BRAY J.R.; CURTIS J.T. An ordination of the upland forest communities of Southern Wisconsin. **Ecological monographs**, Durham, v. 27, n. 4, p. 325-349, 1957.

BRÜCK, W.M.; BRÜCK, T.B.; SELF, W.T.; REED, J.K.; NITECKI, S.S.; MCCARTHY, P.J. Comparison of the anaerobic microbiota of deep-water *Geodia spp.* and sandy sediments in the Straits of Florida. **The ISME Journal**, London, v. 4, n. 5, p. 686-699, 2010.

BRYANT, D.A.; LIU, Z.; LI, T.; ZHAO, F.; COSTAS, A.M.G.; KLATT, C.G.; WARD, D.M.; FRIGAARD, N-U.; OVERMANN, J. Comparative and functional genomics of anoxygenic green bacteria from the taxa Chlorobi, Chloroflexi, and Acidobacteria. In: BURNAP, R.L.; VERMAAS, W.F.J.; OGAWA, T (Ed.). **Functional genomics and evolution of photosynthetic systems**. Dordrecht: Springer, 2012. p. 47–102.

BURGS DORF, I.; SLABY, B.M.; HANDLEY, K.M.; HABER, M.; BLOM, J.; MARSHALL, C.W.; GILBERT, J.A.; HENTSCHEL, U.; STEINDLER, L. Lifestyle evolution in cyanobacterial symbionts of sponges. **mBio**, Washington, v. 6, n. 3, p. e00391-15, 2015.

CAPORASO, J.G.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F.D.; DESANTIS, T.Z.; ANDERSEN, G.L.; KNIGHT, R. PyNASt: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment. **Bioinformatics**, Oxford, v. 26, n. 2, p. 266-267, 2010a.

CAPORASO, J.G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F.D.; COSTELLO, E.K.; FIERER, N.; PEÑA, A.G.; GOODRICH, J.K.; GORDON, J.I.; HUTTLEY, G.A.; KELLEY, S.T.; KNIGHTS, D.; KOENIG, J.E.; LEY, R.E.; LOZUPONE, C.A.; MCDONALD, D.; MUEGGE, B.D.; PIRRUNG, M.; REEDER, J.; SEVINSKY, J.R.; TURNBAUGH, P.J.; WALTERS, W.A.; WIDMANN, J.; YATSUNENKO, T.; ZANEVELD, J.; KNIGHT, R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**, London, v. 7, p. 335-336, 2010b.

CÁRDENAS, C.A.; BELL, J.J.; DAVY, S.K.; HOGGARD, M.; TAYLOR, M.W. Influence of environmental variation on symbiotic bacterial communities of two temperate sponges. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 88, n. 3, p. 516-527, 2014.

CLEARY, D.F.; DE VOOGD, N.J.; POLÓNIA, A.R.; FREITAS, R.; GOMES, N.C. Composition and predictive functional analysis of bacterial communities in seawater, sediment and sponges in the Spermonde Archipelago, Indonesia. **Microbial Ecology**, New York, v. 70, n. 4, p. 889-903, 2015.

CLEARY, D.F.; BECKING, L.E.; VOOGD, N.J.; PIRES, A.C.; POLÓNIA, A.R.; EGAS, C.; GOMES, N. Habitat- and host-related variation in sponge bacterial symbiont communities in Indonesian waters. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 85, n. 3, p. 465-482, 2013.

EASSON, C.G.; THACKER, R.W. Phylogenetic signal in the community structure of host-specific microbiomes of tropical marine sponges. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 5, n. 532, 2014.

EDGAR, R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. **Bioinformatics**, Oxford, v. 26, n. 19, p. 2460-2461, 2010.

EDGAR, R.C.; HAAS, B.J.; CLEMENTE, J.C.; QUINCE, C.; KNIGHT, R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. **Bioinformatics**, Oxford, v. 27, n. 16, p. 2194-2200, 2011.

EDWARDS, A.; LUBBOCK, R. Marine zoogeography of St. Paul's Rocks. **Journal of Biogeography**, Oxford, v. 10, p. 65-72, 1983.

ERPENBECK, D.; BREEUWER, J.; VAN DER VELDE, H.; VAN SOEST, R. Unravelling host and symbiont phylogenies of halichondrid sponges (Demospongiae, Porifera) using a mitochondrial marker. **Marine Biology**, Berlin, v. 141, n. 2, p. 377-386, 2002.

ERPENBECK, D.; SUTCLIFFE, P.; COOK, S.C.; DIETZEL, A.; MALDONADO, M.; VAN SOEST, R.W.; HOOPER, J.N.; WÖRHEIDE, G. Horny sponges and their affairs: on the phylogenetic relationships of keratose sponges. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 63, n. 3, p. 809-816, 2012.

ERWIN P.; THACKER R. Phototrophic nutrition and symbiont diversity of two Caribbean sponge-cyanobacteria symbioses. **Marine Ecology Progress Series**, Oldendorf/Luhe, v. 362, p. 139-147, 2008.

FAN, L.; LIU, M.; SIMISTER, R.; WEBSTER, N.S.; THOMAS, T. Marine microbial symbiosis heats up: the phylogenetic and functional response of a sponge holobiont to thermal stress. **The ISME Journal**, London, v. 7, n. 5, p. 991-1002, 2013.

FAN, L.; REYNOLDS, D.; LIU, M.; STARK, M.; KJELLEBERG, S.; WEBSTER, N.S.; THOMAS, T. Functional equivalence and evolutionary convergence in complex communities of microbial sponge symbionts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 109, n. 27, p. 1878-1887, 2012.

FIESELER, L.; HORN, M.; WAGNER, M.; HENTSCHEL, U. Discovery of the novel candidate phylum "Poribacteria" in marine sponges. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 6, p. 3724-3732, 2004.

GALLISSIAN, M-F.; VACELET J. Ultrastructure de quelques stades de l'ovogenese de spongiaires du genre *Verongia* (Dictyoceratida). **Annales des Sciences Naturelles Zoologie et Biologie Animale**, Paris, v. 18, p. 381-404, 1976.

GAO, Z-M.; WANG, Y.; TIAN, R-M.; WONG, Y.H.; BATANG, Z.B.; AL-SUWAILEM, A.M.; BAJIC, V.B.; QIAN, P-Y. Symbiotic adaptation drives genome streamlining of the cyanobacterial sponge symbiont "*Candidatus Synechococcus spongiarum*." **mBio**, Washington, v. 5, n. 2, p. e00079-14, 2014.

GAO, Z-M.; WANG, Y.; TIAN, R-M.; LEE, O.O.; WONG, Y.H.; BATANG, Z.B.; AL-SUWAILEM, A.M.; LAFI, F.F.; BAJIC, V.B.; QIAN, P-Y. Pyrosequencing revealed shifts of prokaryotic communities between healthy and disease-like tissues of the Red Sea sponge *Crella cyathophora*. **PeerJ**, Corte Madera, v. 3, n. 890, p. 1-13, 2015.

GILES, E.C.; KAMKE, J.; MOITINHO-SILVA, L.; TAYLOR, M.W.; HENTSCHEL, U.; RAVASI, T.; SCHMITT, S. Bacterial community profiles in low microbial abundance sponges. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 83, n. 1, p. 232-241, 2013.

GLOECKNER, V.; WEHRL, M.; MOITINHO-SILVA, L.; GERNERT, C.; SCHUPP, P.; PAWLIK, J.R.; LINDQUIST, N.L.; ERPENBECK, D.; WÖRHEIDE, G.; HENTSCHEL, U. The HMA-LMA dichotomy revisited: an electron microscope survey of 56 sponge species. **The Biological Bulletin**, Lancaster, v. 227, n. 1, p. 78-88, 2014.

HARDOIM, C.C.; COSTA R. Temporal dynamics of prokaryotic communities in the marine sponge *Sarcotragus spinosulus*. **Molecular ecology**, Oxford, v. 23, n. 12, p. 3097-3112, 2014.

HARDOIM, C.C.; COSTA, R.; ARAÚJO, F.V.; HAJDU, E.; PEIXOTO, R.; LINS, U.; ROSADO, A.S.; VAN ELSAS, J.D. Diversity of bacteria in the marine sponge *Aplysina fulva* in Brazilian coastal waters. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 10, p. 3331-3343, 2009.

HARDOIM, C.C.; ESTEVES, A.I.; PIRES, F.R.; GONÇALVES, J.M.; COX, C.J.; XAVIER, J.R.; COSTA, R. Phylogenetically and spatially close marine sponges harbour divergent bacterial communities. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 12, p. e53029, 2012.

HENTSCHEL, U.; PIEL, J.; DEGNAN, S.M.; TAYLOR, M.W. Genomic insights into the marine sponge microbiome. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 10, n. 9, p. 641-654, 2012.

HENTSCHEL, U.; HOPKE, J.; HORN, M.; FRIEDRICH, A.B.; WAGNER, M.; HACKER, J.; MOORE, B.S. Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 9, p. 4431-4440, 2002.

HOFFMANN, F.; RADAX, R.; WOEBKEN, D.; HOLTAPPELS, M.; LAVIK, G.; RAPP, H.T.; SCHLÄPPY, M.-L.; SCHLEPER, C.; KUYPERS, M.M.M. Complex nitrogen cycling in the sponge *Geodia barretti*. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 11, n. 9, p. 2228-2243, 2009.

IMHOFF J.F. Order I. Chromatiales *ord. nov.* In: BRENNER, D.J.; KRIEG, N.R.; STALEY N.R.; GARRITY G.M.; BOONE, D.R.; DE VOS P.; GOODFELLOW M.; RAINEY F.A.; SCHLEIFER K.-H. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2nd ed. New York: Springer, 2005. v. 2: The Proteobacteria, pt. B: The Gammaproteobacteria, p. 1–3.

KAMKE, J.; RINKE, C.; SCHWIENTEK, P.; MAVROMATIS, K.; IVANOVA, N.; SCZYRBA, A.; WOYKE, T.; HENTSCHEL, U. The candidate phylum Poribacteria by single-cell genomics: new insights into phylogeny, cell-compartmentation, eukaryote-like repeat proteins, and other genomic features. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 1, p. e87353, 2014.

KAMKE, J.; SCZYRBA, A.; IVANOVA, N.; SCHWIENTEK, P.; RINKE, C.; MAVROMATIS, K.; WOYKE, T.; HENTSCHEL, U. Single-cell genomics reveals complex carbohydrate degradation patterns in poribacterial symbionts of marine sponges. **The ISME Journal**, London, v. 7, n. 12, p. 2287-2300, 2013.

KAVAMURA, V.N.; TAKETANI, R.G.; LANÇONI, M.D.; ANDREOTE, F.D.; MENDES, R.; MELO, I. S. Water regime influences bulk soil and Rhizosphere of *Cereus jamacaru* bacterial communities in the Brazilian Caatinga biome. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 9, p. e73606, 2013.

KENNEDY, J.; FLEMER, B.; JACKSON, S.A.; MORRISSEY, J.P.; O'GARA, F.; DOBSON, A.D. Evidence of a putative deep sea specific microbiome in marine sponges. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 3, p. e91092, 2014.

KUMBHARE, S.V.; DHOTRE, D.P.; DHAR, S.K.; JANI, K.; APTE, D.A.; SHOUCHE, Y.S.; SHARMA, A. Insights into diversity and imputed metabolic potential of bacterial communities in the continental shelf of Agatti Island. **PLoS One**, San Francisco, v. 10, n. 6, p. e0129864, 2015.

LAFI, F.F.; FUERST, J.A.; FIESELER, L.; ENGELS, C.; GOH, W.W. L.; HENTSCHEL, U. Widespread distribution of Poribacteria in Demospongiae. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 17, p. 5695-5699, 2009.

LANGILLE, M.G.I.; ZANEVELD, J.; CAPORASO, J.G.; MCDONALD, D.; KNIGHTS, D.; REYES, J.A.; CLEMENTE, J.C.; BURKEPILE, D.E.; THURBER, R.L.V.; KNIGHT, R.; BEIKO, R.G.; HUTTENHOWER, C. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. **Nature Biotechnology**, New York, v. 31, n. 9, p. 814-821, 2013.

LÉVI, P.C.; LÉVI P. Embryogenèse de *Chondrosia reniformis* (Nardo), Démospone ovipare, et transmission des bactéries symbiotiques. **Annales des Sciences Naturelles Zoologie et Biologie Animale**, Paris, v. 18, p. 367–380, 1976.

LOPES, L.D.; DE SOUZA LIMA, A.O.; TAKETANI, R.G.; DARIAS, P.; DA SILVA, L.R.F.; ROMAGNOLI, E.M.; LOUVANDINI, H.; ABDALLA, A.L.; MENDES, R. Exploring the sheep rumen microbiome for carbohydrate-active enzymes. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 108, n. 1, p. 15-30, 2015.

LOZUPONE, C.; LLADSER, M.E.; KNIGHTS, D.; STOMBAUGH, J.; KNIGHT, R. UniFrac: an effective distance metric for microbial community comparison. **The ISME Journal**, London, v. 5, n. 2, p. 169, 2011.

McDONALD, D.; PRICE, M.N.; GOODRICH, J.; NAWROCKI, E.P.; DESANTIS, T.Z.; PROBST, A.; ANDERSEN, G.L.; KNIGHT, R.; HUGENHOLTZ, P. An improved greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. **The ISME Journal**, London, v. 6, n. 3, p. 610-618, 2012.

MEYER, C.P.; GELLER, J.B.; PAULAY G. Fine scale endemism on coral reefs: Archipelagic differentiation in turbinid gastropods. **Evolution**, Lawrence, v. 59, n. 1, p. 113-125, 2005.

MIZUNO, C.M.; RODRIGUEZ-VALERA, F.; GHAI R. Genomes of planktonic Acidimicrobiales: widening horizons for marine actinobacteria by metagenomics. **mBio**, Washington, v. 6, n. 1, p. e02083-14, 2015.

MOELLER, A.H.; PEETERS, M.; NDJANGO, J.B.; LI, Y.; HAHN, B.H.; OCHMAN, H. Sympatric chimpanzees and gorillas harbor convergent gut microbial communities. **Genome Research**, New York, v. 23, n. 10, p. 1715-1720, 2013.

MONTALVO, N.F.; HILL, R.T. Sponge-associated bacteria are strictly maintained in two closely related but geographically distant sponge hosts. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, n. 20, p. 7207-7216, 2011.

MORAES, F. **Esponjas das ilhas oceânicas brasileiras**. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2011. 252 p. (Série Livros, 44).

MORROW, C.; CÁRDENAS, P. Proposal for a revised classification of the Demospongiae (Porifera). **Frontiers in Zoology**, London, v. 12, n. 1, p. 1, 2015.

MORROW, K.M.; BOURNE, D.G.; HUMPHREY, C.; BOTTÉ, E.S.; LAFFY, P.; ZANEVELD, J.; UTHICKE, S.; FABRICIUS, K.E.; WEBSTER, N. S. Natural volcanic CO₂ seeps reveal future trajectories for host–microbial associations in corals and sponges. **The ISME Journal**, London, v. 9, n. 4, p. 894-908, 2015.

NAIM, M.A.; MORILLO, J.A.; SØRENSEN, S.J.; WALEED, A. A-S.; SMIDT, H.; SIPKEMA, D. Host-specific microbial communities in three sympatric North Sea sponges. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 90, n. 2, p. 390-403, 2014.

OCHMAN, H.; WOROBEY, M.; KUO, C-H.; NDJANGO, J-B.N.; PEETERS, M.; HAHN, B.H.; HUGENHOLTZ, P. Evolutionary relationships of wild hominids recapitulated by gut microbial communities. **PLoS Biology**, San Francisco, v. 8, n. 11, p. e1000546, 2010.

O'CONNOR-SÁNCHEZ, A.; RIVERA-DOMÍNGUEZ, A.J.; DE LOS SANTOS-BRIONES, C.; LÓPEZ-AGUIAR, L.K.; PEÑA-RAMÍREZ, Y.J.; PRIETO-DAVO, A. Acidobacteria appear to dominate the microbiome of two sympatric Caribbean sponges and one Zoanthid. **Biological Research**, Santiago, v. 47, n. 1, p. 1, 2014.

OLSON, J.B.; THACKER, R.W.; GOCHFELD, D.J. Molecular community profiling reveals impacts of time, space, and disease status on the bacterial community associated with the Caribbean sponge *Aplysina cauliformis*. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 87, n. 1, p. 268-279, 2014.

OREN, M.; STEINDLER, L.; ILAN, M. Transmission, plasticity and the molecular identification of cyanobacterial symbionts in the Red Sea sponge *Diacarnus erythraenus*. **Marine Biology**, Berlin, v. 148, n. 1, p. 35-41, 2005.

POLÓNIA, A.R.; CLEARY, D.F.; FREITAS, R.; VOOGD, N.J.; GOMES, N. The putative functional ecology and distribution of archaeal communities in sponges, sediment and seawater in a coral reef environment. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 24, n. 2, p. 409-423, 2015.

REISWIG, H.M. Bacteria as food for temperate-water marine sponges. **Canadian Journal of Zoology**, Ottawa, v. 53, n. 5, p. 582-589, 1975.

REVEILLAUD, J.; MAIGNIEN, L.; EREN, A.M.; HUBER, J.A.; APPRILL, A.; SOGIN, M.L.; VANREUSEL, A. Host-specificity among abundant and rare taxa in the sponge microbiome. **The ISME Journal**, London, v. 8, n. 6, p. 1198-1209, 2014.

RIBES, M.; JIMÉNEZ, E.; YAHIEL, G.; LÓPEZ-SENDINO, P.; DÍEZ, B.; MASSANA, R.; SHARP, J.H.; COMA, R. Functional convergence of microbes associated with temperate marine sponges. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 14, n. 5, p. 1224-1239, 2012.

ROT, C.; GOLDFARB, I.; ILAN, M.; HUCHON, D. Putative cross-kingdom horizontal gene transfer in sponge (Porifera) mitochondria. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 6, n. 1, p. 71, 2006.

SCHMITT, S.; DEINES, P.; BEHNAM, F.; WAGNER, M.; TAYLOR, M.W. Chloroflexi bacteria are more diverse, abundant, and similar in high than in low microbial abundance sponges. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 78, n. 3, p. 497-510, 2011.

SCHMITT, S.; TSAI, P.; BELL, J.; FROMONT, J.; ILAN, M.; LINDQUIST, N.; PEREZ, T.; RODRIGO, A.; SCHUPP, P.J.; VACELET, J.; WEBSTER, N.; HENTSCHEL, U.; TAYLOR, M.W. Assessing the complex sponge microbiota: core, variable and species-specific bacterial communities in marine sponges. **The ISME Journal**, London, v. 6, n. 3, p. 564-576, 2012.

SCHÖTTNER, S.; HOFFMANN, F.; CÁRDENAS, P.; RAPP, H.T.; BOETIUS, A.; RAMETTE, A. Relationships between host phylogeny, host type and bacterial community diversity in cold-water coral reef sponges. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 2, p. e55505, 2013.

SIEGL, A.; KAMKE, J.; HOCHMUTH, T.; PIEL, J.; RICHTER, M.; LIANG, C.; DANDEKAR, T.; HENTSCHEL, U. Single-cell genomics reveals the lifestyle of Poribacteria, a candidate phylum symbiotically associated with marine sponges. **The ISME Journal**, London, v. 5, n. 1, p. 61-70, 2011.

SIMISTER, R.L.; DEINES, P.; BOTTÉ, E.S.; WEBSTER, N.S.; TAYLOR, M.W. Sponge-specific clusters revisited: a comprehensive phylogeny of sponge-associated microorganisms. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 14, n. 2, p. 517-524, 2012a.

SIMISTER, R.; TAYLOR, M.W.; TSAI, P.; FAN, L.; BRUXNER, T.J.; CROWE, M.L.; WEBSTER, N. Thermal stress responses in the bacterial biosphere of the Great Barrier reef sponge, *Rhopaloeides odorabile*. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 14, n. 12, p. 3232-3246, 2012b.

SIPKEMA, D.; CARALT, S.; MORILLO, J.A.; AL-SOUD, W.A.; SØRENSEN, S.J.; SMIDT, H.; URIZ, M.J. Similar sponge-associated bacteria can be acquired via both vertical and horizontal transmission. **Environmental microbiology**, Oxford, v. 17, n. 10, p. 3807-3821, 2015.

SOGIN, M.L.; MORRISON, H.G.; HUBER, J.A.; WELCH, D.M.; HUSE, S.M.; NEAL, P.R.; ARRIETA, J.M.; HERNDL, G. J. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 103, n. 32, p. 12115-12120, 2006.

STALEY, C.; GOULD, T.J.; WANG, P.; PHILLIPS, J.; COTNER, J.B.; SADOWSKY, M.J. Core functional traits of bacterial communities in the Upper Mississippi River show limited variation in response to land cover. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 5, n. 414, p. 1-11, 2014.

TAYLOR, M.W.; RADAX, R.; STEGER, D.; WAGNER, M. Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology, and biotechnological potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 71, n. 2, p. 295-347, 2007.

THOMPSON, A.L.; MONTEAGUDO-MERA, A.; CADENAS, M.B.; LAMPL, M.L.; AZCARATE-PERIL, M.A. Milk-and solid-feeding practices and daycare attendance are associated with differences in bacterial diversity, predominant communities, and metabolic and immune function of the infant gut microbiome. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Lausanne, v. 5, n. 3, p. 1-15, 2015.

TURQUE, A.S.; BATISTA, D.; SILVEIRA, C.B.; CARDOSO, A.M.; VIEIRA, R.P.; MORAES, F.C.; CLEMENTINO, M.M.; ALBANO, R.M.; PARANHOS, R.; MARTINS, O.B.; MURICY, G. Environmental shaping of sponge associated archeal communities. **PLoS One**, San Francisco, v. 5, n. 12, p. e15774, 2010.

TZENG, T.D.; PAO, Y.Y.; CHEN, P.C.; WENG, F.C.H.; JEAN, W.D.; WANG, D. Effects of host phylogeny and habitats on gut. **PLoS One**, San Francisco, v. 10, n. 7, p. e0132860, 2015.

USHER, K.M.; SUTTON, D.C.; TOZE, S.; KUO, J.; FROMONT, J. Inter-generational transmission of microbial symbionts in the marine sponge *Chondrilla australiensis* (Demospongiae). **Marine and Freshwater Research**, Melbourne, v. 56, n. 2, p. 125-131, 2005.

VACELET, J. Étude en microscopie électronique de l'association entre bactéries et spongiaires du genre *Verongia* (Dictyoceratida). **Journal de Microscopie et de Biologie Cellulaire**, Paris, v. 23, n. 3, p. 271–288, 1975.

VOOGD, N.J.; CLEARY, D.F.; POLÓNIA, A.R.; GOMES, N.C. Bacterial community composition and predicted functional ecology of sponges, sediment and seawater from the thousand islands reef complex, West Java, Indonesia. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 91, n. 4, p. fiv019, 2015.

WAITE, D.W.; TAYLOR, M.W. Characterizing the avian gut microbiota: membership, driving influences, and potential function. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 5, n. 223, p. 1-12, 2014.

WANG, Y.; QIAN P-Y. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. **PLoS One**, San Francisco, v. 4, n. 10, p. e7401, 2009.

WEBSTER, N.S.; TAYLOR, M.W.; BEHNAM, F.; LÜCKER, S.; RATTEI, T.; WHALAN, S.; HORN, M.; WAGNER, M. Deep sequencing reveals exceptional diversity and modes of transmission for bacterial sponge symbionts. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 12, n. 8, p. 2070-2082, 2010.

WEBSTER, N.; PANTILE, R.; BOTTE, E.; ABDO, D.; ANDREAKIS, N.; WHALAN, S. A complex life cycle in a warming planet: gene expression in thermally stressed sponges. **Molecular ecology**, Oxford, v. 22, n. 7, p. 1854-1868, 2013a.

WEBSTER, N.S.; LUTER, H.M.; SOO, R.M.; BOTTÉ, E.S.; SIMISTER, R.L.; ABDO, D.; WHALAN, S. Same, same but different: symbiotic bacterial associations in GBR sponges. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 3, n. 444, p. 1-11, 2013b.

5 CARACTERIZAÇÃO DAS COMUNIDADES BACTERIANAS ASSOCIADAS ÀS ESPONJAS *Didiscus oxeata* E *Scopalina ruetzleri* POR ABORDAGENS DEPENDENTE E INDEPENDENTE DE CULTIVO

“A educação é a mais poderosa arma
pela qual se pode mudar o mundo.”

- Nelson Mandela

Resumo

Neste estudo, técnicas moleculares dependentes e independentes de cultivo foram usadas para caracterizar as comunidades bacterianas habitando às esponjas *Didiscus oxeata* e *Scopalina ruetzleri*. Amostras individuais de cada espécie de esponja foram examinadas quanto à diversidade e composição de comunidades bacterianas usando a plataforma Ion torrent para sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. As amostras de água do mar foram coletadas para comparações com a microbiota de esponjas. As análises independentes de cultivo detectaram um complexo e específico sistema microbiano associado a cada esponja hospedeira, com as unidades taxonômicas operacionais dominantes classificadas nos filos: Acidobacteria, Actinobacteria, Chloroflexi, Proteobacteria e Gemmatimonadetes. Foi observado que as comunidades bacterianas diferiram significativamente entre as espécies de esponjas e se diferenciaram da comunidade detectada na água do mar. A abordagem dependente de cultivo propiciou o isolamento de cinquenta e seis linhagens bacterianas que foram classificadas nos filos: Actinobacteria, Proteobacteria e Firmicutes. As análises filogenéticas indicaram que as bactérias cultivadas foram, em sua maioria, já isoladas ou detectadas no ambiente marinho. Sendo que bactérias classificadas como *Terrabacter* sp., *Saccharopolyspora* sp. *Nocardioides* sp. *Tsukamurella* sp. e *Pantoea* sp. podem representar novas espécies marinhas. O método dependente de cultivo favoreceu o isolamento de bactérias que foram detectadas em alta abundância na abordagem independente de cultivo. Ainda assim, algumas bactérias cultivadas não foram detectadas na análise independente de cultivo. Portanto, é imperativo que uma combinação de diferentes técnicas, tais como métodos dependentes e independentes de cultivo, possam ser empregadas para determinar a real diversidade bacteriana nesse “micro habitat”.

Palavras-chave: Comunidades bacterianas; Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA; Arquipélago de São Pedro e São Paulo; Brasil

Abstract

In this study, culture-dependent and -independent molecular methods were used to characterize the bacterial communities inhabiting the sponges *Didiscus oxeata* and *Scopalina ruetzleri*. Individual samples of each sponge species were examined for the diversity and composition of bacterial communities by using the Ion Torrent platform for partial sequencing of the 16S rRNA gene. Seawater surrounding specimens were collected for comparisons. The analysis culture-independent detected a complex and specific microbial system living in sponges, with the operational taxonomic units dominant classified in the phyla: Acidobacteria, Actinobacteria, Chloroflexi, Proteobacteria and Gemmatimonadetes. The bacterial communities differed significantly between sponge species and the seawater. All the

fifty-six isolates obtained by culture-dependent method were represented by three bacterial phyla: Actinobacteria, Firmicutes and Proteobacteria. Phylogenetic analysis indicated that the cultured bacteria were already isolated or detected in the marine environment. In contrast, bacteria classified as *Terrabacter* sp., *Saccharopolyspora* sp., *Nocardioides* sp., *Tsukamurella* sp. and *Pantoea* sp. may represent novel species isolated in this environment. The culture-dependent method favored the isolation of bacteria that were detected in high abundance using culture-independent approaches. However, some cultured bacteria were not detected in culture-independent methods. Therefore, it is imperative that a combination of different approaches, both by using culture-dependent and –independent methods may be employed to determine the real bacterial diversity in this “micro habitat”.

Keywords: Bacterial communities; Partial 16S rRNA gene sequencing; St. Peter and St. Paul Archipelago; Brazil

5.1 Introdução

A microbiologia de esponjas está passando por um momento de grande avanço na compreensão da riqueza, diversidade e função das comunidades bacterianas que habitam esses animais. Este fato pode estar relacionado ao amplo acesso às tecnologias de sequenciamento de nova geração (FAN et al., 2012; SCHMITT et al., 2012; REVEILLAUD et al., 2014; RUA et al., 2015; THOMAS et al., 2016). No entanto, recentes trabalhos enfatizam a necessidade de integrar análises dependentes e independentes de cultivo para obter um completo entendimento da distribuição, ecologia, diversidade genética e papéis funcionais desse complexo consórcio microbiano vivendo em esponjas (JACKSON et al., 2012; MONTALVO et al., 2014; HARDOIM et al., 2015; ESTEVES et al., 2016).

O cultivo é uma importante ferramenta para estudar as funções fisiológicas e ecológicas dos microrganismos e também pode fornecer o acesso a bactérias que têm escapado da detecção com abordagens moleculares (HARDOIM et al., 2015). Estudos dependentes de cultivo têm tentado acessar o máximo da diversidade de microrganismos presente em esponjas, através do uso de diferentes meios de isolamento (HARDOIM et al., 2015; ESTEVES et al., 2016), ou então, tem como principal objetivo isolar grupos bacterianos específicos (SILVA, 2015; SUN et al., 2015).

Esponjas e sua microbiota têm atraído grande interesse nos últimos anos. Duas razões para este interesse são: i) o estudo das interações microbiota-esponja como um modelo evolutivo mais antigo de simbiose com organismos multicelulares e

ii) bactérias isoladas de esponjas produzem substâncias químicas únicas, as quais são interessantes para diversos setores industriais (FUERST, 2014; BLUNT et al. 2015). Recentemente, nosso grupo de pesquisa isolou membros do filo Actinobacteria associado à esponja *Aplysina fulva*, e avaliou o perfil químico de metabólitos excretados no caldo de cultivo destes microrganismos (SILVA, 2015). Ademais, a estratégia utilizada por Silva (2015) possibilitou a descrição de um nova linhagem de Streptomyces com propriedades fitotóxica e anti-fúngica.

Estudos similares têm levado ao isolamento de novos gêneros e espécies a partir de outros filos (LAU et al., 2005, 2006a, 2006b; LEE et al., 2006a, 2006b, 2007; SCHEUERMAYER et al., 2006; ZHANG et al., 2006; GRAEBER et al., 2008; SEO et al., 2009; MITRA et al., 2009; YOON; OH, 2011, 2012; NISHIJIMA et al., 2013; JACKSON et al., 2015; JANG et al., 2015; YOON et al., 2013, 2015; YANG et al., 2015). Atualmente, membros dos filos Actinobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Firmicutes, Planctomycetes, Proteobacteria e Verrucomicrobia têm sido isolados de diversas espécies de esponjas em todo o mundo (HENTSCHEL et al., 2001; JACKSON et al., 2012; JUNG et al., 2014; LAVY et al., 2014; MONTALVO et al., 2014; HARDOIM et al., 2015; ESTEVES et al., 2016). Contudo, em especial no Brasil, poucos estudos têm sido direcionados a isolar e caracterizar bactérias associadas a animais marinhos (MENEZES et al., 2010; SANTOS-GANDELMAN et al., 2013; SANTOS et al., 2010, 2015; LAPORT et al., 2016).

As esponjas *Didiscus oxeata* e *Scopalina ruetzleri* são amplamente distribuídas na costa das Américas (RUA et al., 2015). Há relatos de *D. oxeata* em áreas costeiras do golfo do México, no mar do Caribe e no nordeste do Brasil (revisado por MORAES, 2011). Já a esponja incrustante *S. ruetzleri* ocorre no mar do Caribe e no Oceano Atlântico, onde ela é frequentemente associada a recifes de corais e sob substrato rochoso ou calcário (revisado por MORAES, 2011). No arquipélago de São Pedro e São Paulo (ASPSP), estas espécies de esponjas são as mais abundantes, colonizando paredões rochosos e também piscinas de maré (MORAES, 2011; RUA et al., 2015). Utilizando abordagens moleculares e microscópicas, a esponja *S. ruetzleri* foi caracterizada como uma esponja de baixa abundância microbiana, (POPPELL et al., 2013; GLOECKNER et al., 2014; RUA et al., 2015), ao passo que existe uma falta de dados microscópicos em *D. oxeata*. Contudo, recente observação molecular da composição, diversidade e riqueza das

associações microbianas em *D. oxeata*, possibilitou a sua classificação como uma esponja de alta abundância microbiana (RUA et al., 2015).

Apesar dos esforços de Rua et al. (2015) em descrever as composições e estratégias funcionais dos holobiontes *D. oxeata* e *S. ruetzleri*, que vivem no ASPSP, há uma carência de estudos a cerca da real diversidade de associações bacterianas para estes animais. Além do mais, no estudo de Rua et al. (2015) as amostras de *S. ruetzleri* revelaram uma comunidade microbiana bastante heterogênea. Até o momento, poucos trabalhos investigaram em profundidade as bactérias cultivadas associadas a estes animais. Trabalhos pontuais descrevem o cultivo de Alphaproteobacteria a partir da esponja *D. oxeata* (ENTICKNAP et al., 2006), enquanto o isolamento de membros do filo Actinobacteria foram examinados em *S. ruetzleri* (TABARES et al., 2011; VICENTE et al., 2013, 2015). Contudo, nenhum destes estudos forneceram estratégias integradas de análises dependentes e independentes de cultivo para obter uma visão geral da comunidade bacteriana associadas a seus hospedeiros.

O objetivo deste estudo foi combinar ambas as técnicas dependentes e independentes de cultivo como uma estratégia polifásica para caracterizar os perfis das comunidades bacterianas das esponjas *D. oxeata* e *S. ruetzleri*, as quais ocorrem em proximidade espacial no remoto ASPSP. Para esta finalidade, amostras individuais de cada espécie de esponja foram examinadas quanto à diversidade e composição de comunidades bacterianas usando a plataforma Ion torrent para sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. Devido ao alto endemismo para este local de coleta, cada esponja hospedeira foi identificada usando sequenciamento parcial do gene mtCO1. Amostras da água do mar foram coletadas para comparações com a comunidade bacteriana de esponjas.

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Amostragem e identificação das esponjas

Sete espécimes de *S. ruetzleri* e oito de *D. oxeata* foram coletadas no remoto ASPSP. A identidade dos espécimes foi confirmada por examinar caracteres morfológicos, seguindo literatura especializada (MORAES, 2011). Esta etapa foi concluída com a colaboração do Dr. Fernando Moraes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, no Brasil. Sequenciamento da subunidade 1 do gene mitocondrial

citocromo c oxidase (CO1) foi realizado devido à alta taxa de endemismo de esponjas do ASPSP, conforme previamente reportado por Moraes (2011). As reações de PCR e sequenciamento foram realizadas de acordo com Meyer et al. (2005) e Rot et al. (2006), usando oligonucleotídeos que amplificam a região padrão do gene CO1. As amostras das duas espécies de esponjas foram coletadas na piscina de maré, dentro da ilha Belmonte (2 m de profundidade), na enseada, sobre substrato rochoso (12 m de profundidade) e no paredão oeste das ilhas Belmonte e Barão de Teffé (20 m de profundidade), como ilustrado na Figura 13. Os espécimes foram colocados separadamente em tubos Falcon de 50 mL contendo água do mar. Um pequeno fragmento de cada espécie foi separado para cultivo bacteriano e o remanescente foi congelado para transporte ao laboratório. Água do mar foi coletada no sítio de amostragem das esponjas usando uma garrafa de Van Dorn e filtradas com uma membrana de policarbonato de 0,22 μm (Millipore, MA, USA). A água do mar foi usada para comparações com microbiomas de esponjas.

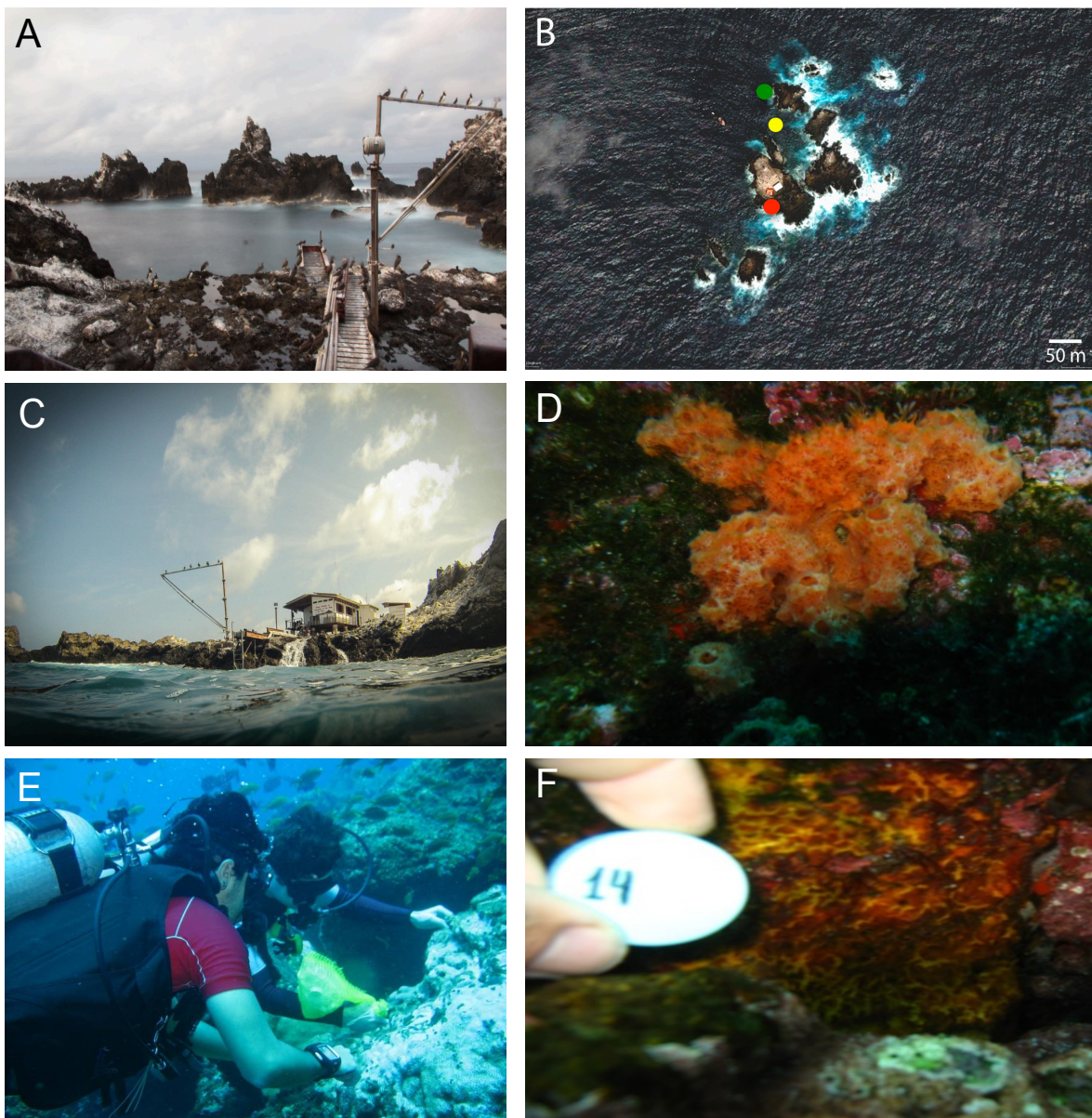


Figura 13 - Arquipélago de São Pedro e São Paulo no Atlântico Equatorial ($0^{\circ} 55'02''$ N, $29^{\circ} 20'44''$ O) e aspectos *in situ* dos sítios de amostragem. **A**, imagem tirada do cais mostrando a enseada; **B**, imagem de satélite do ASPSP com os locais de amostragem (enseada, ponto amarelo; piscina de maré, ponto vermelho; paredão oeste das ilhas Belmonte e Barão de Teffé, ponto verde); **C**, vista da enseada, com destaque para o laboratório; **D**, imagem obtida da esponja incrustante *S. ruetzleri*; **E**, mergulho autônomo no paredão oeste das ilhas Belmonte e Barão de Teffé; **F**, imagem aproximada da esponja *D. oxeata*. B, imagem de satélite (SIO NOAA, US Navy, NGA GEBCO) / *Pro software Google Earth*; A, C-F, fotografias *in situ* por R. Taketani

5.2.2 Isolamento de bactérias heterotróficas

No laboratório, as amostras previamente separadas para cultivo bacteriano foram enxaguadas três vezes com água do mar artificial autoclavada (33 g L⁻¹ Red Sea Salt®, Red Sea, Houston, TX, USA) e detritos aderidos aos tecidos dos animais foram retirados com o auxílio de um bisturi.

Um fragmento de cerca de 1 cm³ de cada amostra por espécie hospedeira foi combinado para formar amostras compostas. Essas amostras foram trituradas, separadamente, usando almofariz autoclavado. Após a trituração, as amostras foram transferidas para frascos Erlenmeyer contendo esferas de vidro e homogeneizadas em 90 mL de água do mar por 20 min. Em seguida, diluições seriadas na razão 10⁻¹ até 10⁻⁵ foram realizadas e alíquotas de 100 µL foram transferidas para os meios de cultivo sólido: M1, SM3, 410 e HVA (Tabela 2, Anexo A). Os meios de cultivo foram feitos com água do mar artificial e adicionados com 10 µg de ciclohexamida ou 25 µg de nistatina para restringir o crescimento fúngico. Todo o procedimento foi realizado utilizando manobras assépticas dentro de uma câmara de fluxo laminar.

As placas de cultivo foram incubadas a 25 °C por 4 semanas. Após crescimento bacteriano, todas as colônias com morfotipos distintos foram transferidas para novas placas. A técnica de esgotamento de células foi utilizada até obtenção das culturas puras. Os isolados foram preservados em glicerol 20%.

5.2.2 Classificação taxonômica dos isolados bacterianos

O DNA foi extraído de culturas puras usando o *kit PureLink® Genomic DNA* (Invitrogen, USA), conforme instruções do fabricante. A amplificação do gene que codifica para o rRNA 16S foi realizado como descrito por Kim et al. (1996), utilizando o conjunto de oligonucleotídeos 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1492R (5'TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') (LANE, 1991).

Para sequenciamento dos fragmentos de interesse foi utilizado o *kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems/Life Technologies, Foster City, CA, USA) de acordo com instruções do fabricante. Para isto, os produtos de PCR foram purificados enzimaticamente com FastAP mais Exo I (Life Technologies, San Diego, CA, USA) e quantificados com *low mass DNA ladder* (Invitrogen, USA). O sequenciamento foi realizado em um analisador genético *Applied Biosystems*

3500, usando os oligonucleotídeos senso e anti-senso utilizados para amplificação do gene. Em adição, outros iniciadores internos foram utilizados para obter mais do que 1.200 pb de comprimento do gene rRNA 16S (LANE, 1991). As sequências foram analisadas quanto à qualidade e montadas em *contig* com o *software Sequencher® Gene Codes Corporation* (www.genecodes.com) e checadas para potencial contaminação utilizando a ferramenta *online Decipher* (WRIGHT et al., 2012).

As sequências obtidas foram comparadas com sequências mais próximas depositadas nos bancos de dados do Genbank e os cálculos de identidade das sequências foram obtidos usando o servidor Ez-Taxon (KIM et al. 2012). Sequências com alta identidade de nucleotídeos (>97%), compondo linhagens tipo de referência e sequências geradas em bibliotecas de clones foram selecionadas no GenBank para a montagem das árvores filogenéticas. O alinhamento do conjunto de dados foi realizado com o ClustalW (THOMPSON et al., 1994). As árvores filogenéticas foram inferidas utilizando o método de neighbor-joining (SAITOU; NEI, 1987) e/ou máxima verossimilhança (FELSENSTEIN, 1981), no programa MEGA 5.2 (TAMURA et al., 2011).

5.2.3 Sequenciamento em larga escala de fragmentos do gene 16S rRNA

O DNA total foi extraído dos tecidos das esponjas e filtros enriquecidos com a comunidade planctônica usando o *kit* comercial *Power Soil DNA isolation* (Mo Bio, Carlsbad, CA, USA), seguindo instruções do fabricante. O conjunto de primers 967F (CAA CGC GAA GAA CCT TAC C; SOGIN et al., 2006) e 1193R (CGT CRT CCC CRC CTT CC; WANG; QIAN, 2009) foi utilizado para amplificação da região hipervariável V6 do gene 16S rRNA. As reações de PCR foram realizadas de acordo com Kavamura et al. (2013). Após amplificação, os fragmentos contendo os “barcodes” foram quantificados por *Qubit®* (Invitrogen, USA) e a concentração de cada amostra foi ajustada para uma razão equimolar. Em seguida, a biblioteca de *amplicon* foi misturada e purificada usando *Agencourt AMPure XP* (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). PCR em emulsão foi realizada usando o *Ion OneTouch 2™* com o *Kit Ion Template PGM™ OT2 400* (Life Technologies, San Diego, CA, USA) de acordo com instruções do fabricante. Após o enriquecimento e coleta das

esferas, as amostras foram preparadas para serem carregadas em um *chip Ion* 316™ usando o sistema *Ion Torrent* (PGM-*Personal Genome Machine*™).

Após sequenciamento, os dados gerados foram filtrados pelo *software* PGM para remover sequências policlonais e de baixa qualidade, rendendo um total de 480.670 sequências. O arquivo de sequências (.fastq) foi exportado e analisado como descrito abaixo.

5.2.4 Controle de qualidade e assinaturas taxonômicas

Sequências brutas foram filtradas por qualidade (média de escore de qualidade=25, tamanho da janela=5 bases e número máximo de homopolímeros=6) e ajustadas para um comprimento mínimo de 150 pb com o *software Galaxy* (<https://main.g2.bx.psu.edu>). Após processamento, 253.652 sequências foram analisadas usando o *kit* de ferramentas *Quantitative Insights Into Microbial Ecology* (QIIME) versão 1.8 (CAPORASO et al., 2010a). Este software foi utilizado para identificar unidades taxonômicas operacionais (UTOs) com 97% de similaridade usando o método UCLUST (EDGAR, 2010). Uma sequência representativa de cada UTO foi alinhada frente a um arquivo Greengenes usando o algoritmo NAST (CAPORASO et al., 2010b). Sequências quimera foram removidas usando o método UCHIME (EDGARD et al., 2011). As classificações taxonômicas foram realizadas usando o método UCLUST com um arquivo Greengenes de referência (MCDONALD et al. 2012). Sequências não alvo (ex. cloroplastos, mitocôndrias, não classificadas ao nível de domínio “uncultured” e DNA *singletons*) foram removidas do conjunto de dados. Após processamento, 115.152 sequências foram classificadas para 4.169 UTOs, e uma tabela de amostras *versus* UTOs foi criada e usada em análises descritas abaixo.

5.2.5 Estimativa da diversidade bacteriana e análise de dados de sequenciamento

As sequências foram normalizadas para o menor esforço de amostragem, o qual compreendeu 1.690 sequências para cada amostra. As classificações taxonômicas das sequências foram resumidas aos níveis de filo e classe. No entanto, quando possível, as sequências obtidas foram também classificadas em nível de gênero. Medidas de alfa diversidade entre os espécimes foram calculadas

(espécies observadas, chao1, Shannon e Simpson) usando o software R (R-project, 2014) com o pacote Phyloseq (MCMURDIE; HOLMES, 2013). Os dados normalizados foram analisados usando a matriz de distância Bray-Curtis e agrupados por NMDS utilizando o software PAST. O teste de análise de similaridade (ANOSIM) foi utilizado para avaliar estatisticamente se há uma significativa diferença entre os conjuntos de dados. Os valores de significância foram baseados em 9.999 permutações e corrigidos usando Bonferroni *post hoc* para múltiplas comparações aos pares. O grau pelo qual as UTOs foram compartilhadas ou únicas entre as amostras foi visualizada usando diagramas de Venn-Euller.

5.3 Resultados

5.3.1 Identificação taxonômica das esponjas

A abordagem integrando dados morfológicos e sequenciamento do gene mitocondrial CO1 confirmou a identidade dos espécimes como *Scopalina ruetzleri* (Wiedenmayer, 1977) e *Didiscus oxeata* (Hechtel, 1983), ambos pertencentes à subclasse Heteroscleromorpha (Figura 14). Não foi observada variação intra-específica entre sequências mtCO1 das duas espécies estudadas. Comparações no GenBank das sequências de DNA obtidas neste estudo revelaram 99% de identidade com sequências dos seus respectivos taxa coletados no mar do Caribe.

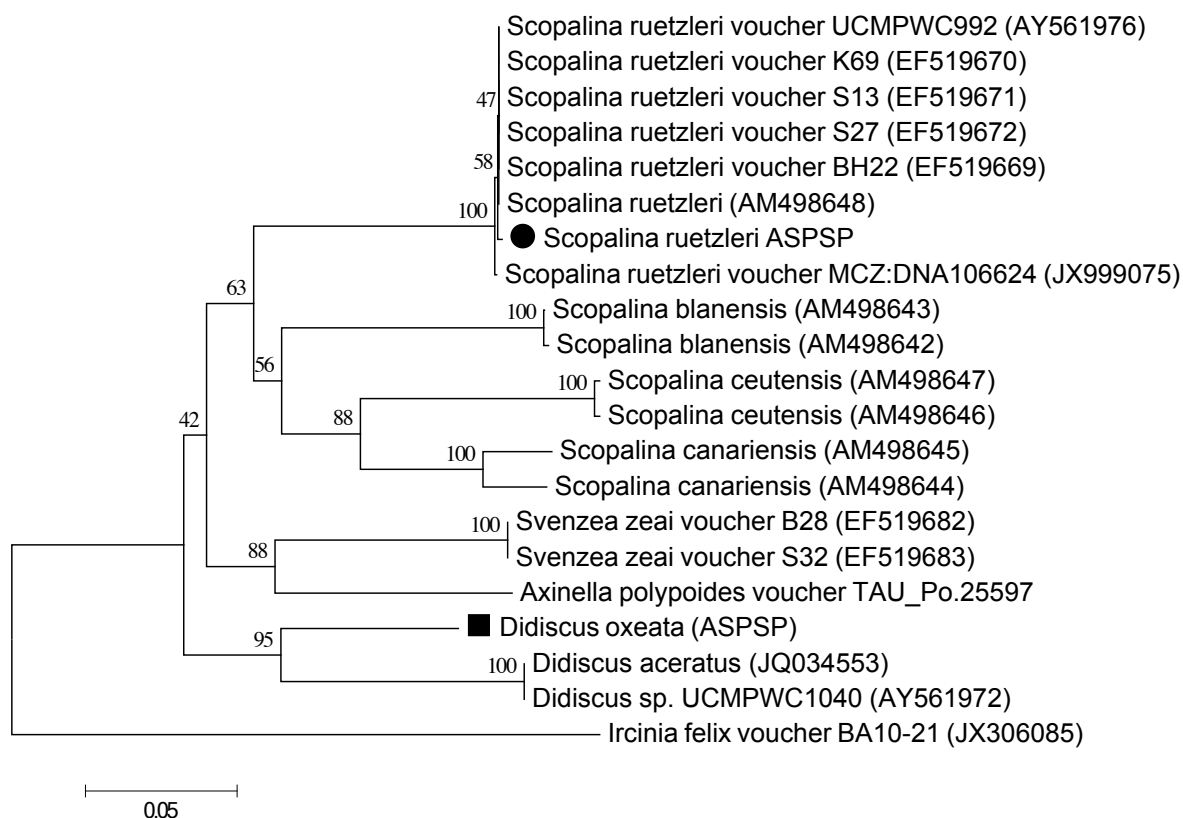


Figura 14 - Árvore Neighbor-Joining mostrando as relações filogenéticas de sequências do fragmento do gene CO1 de esponjas da subclasse Heteroscleromorpha. Sequências geradas neste estudo são destacadas com um círculo e quadrado preenchidos em preto. Um total de 571 posições foram consideradas para a reconstrução filogenética. A esponja Keratosa *Ircinia felix* foi usada como grupo externo

5.3.2 Análise da composição de bactérias cultivadas

Sequências parciais (>1.200 pb) do gene 16S rRNA foram obtidas para 56 isolados bacterianos. Comparações das sequências de nucleotídeos com outras sequências depositadas no servidor Ez-taxon revelaram valores de identidade de nucleotídeos variando entre 98,24 a 100% (Tabela 3). Estes valores de identidade de sequências permitiram classificar os isolados como membros de 3 filos bacterianos: Actinobacteria, Firmicutes e Proteobacteria.

Na esponja *S. ruetzleri* bactérias cultivadas dentro do filo Actinobacteria foram classificadas em 7 gêneros: *Brevibacterium*, *Gordonia*, *Saccharopolyspora*,

Arthrobacter, *Geodermatophilus*, *Tsukamurella* e *Streptomyces*. Ao passo que a esponja *D. oxeata* apresentou membros classificados em 6 gêneros: *Terrabacter*, *Microbacterium*, *Nocardioides*, *Kocuria*, *Arthrobacter* e *Tsukamurella* (Figura 15).

Bactérias cultivadas pertencentes ao filo Proteobacteria foram classificadas nas classes Alpha-, Beta- e Gammaproteobacteria, sendo este último o mais abundante grupo. Os filotipos dentro da classe Gammaproteobacteria foram classificados como *Pseudomonas* sp., *Psychrobacter* sp., *Pseudoalteromonas* sp., *Halomonas* sp., *Cobetia* sp., *Shewanella* sp., *Vibrio* sp., *Oceanimonas* sp. e *Stenotrophomonas* sp. Em *D. oxeata* 6 gêneros de Gammaproteobacteria foram isolados, ao passo que 4 gêneros de Gammaproteobacteria foram isolados em *S. ruetzleri* (Tabela 3). Apenas a bactéria *Cobetia* sp. foi isolada nas duas esponjas, mas compreendendo filotipos distintos pertencentes para o clado *Cobetia marina* (Figura 16). Dentro da classe Alphaproteobacteria foram isolados *Sulfitobacter* sp. e *Paracoccus* sp. associados com *D. oxeata*. Adicionalmente, uma linhagem incluída na classe Betaproteobacteria foi também isolada de *D. oxeata* e classificado como *Achromobacter* sp.

Bactérias pertencentes ao filo Firmicutes foram isoladas nas duas esponjas e classificadas, predominantemente, como *Bacillus* sp., embora dois isolados classificados como *Brevibacillus* sp. e *Carnobacterium* sp. foram também encontrados nas esponjas *S. ruetzleri* e *D. oxeata*, respectivamente (Tabela 3).

Em geral, apesar dos perfis das comunidades mostrarem similaridade em nível de gênero, uma vez que isolados geneticamente relacionados para *Arthrobacter* sp., *Tsukamurella* sp., *Cobetia* sp. e *Bacillus* sp. foram detectados nas duas espécies de esponjas (Figuras 15 e 16), as duas esponjas apresentaram diferentes comunidades cultivadas.

Tabela 3 – Classificação taxonômica de bactérias isoladas das esponjas *Didiscus oxeata* e *Scopalina ruetzleri* (continua)

Código do isolado	Origem do isolado	Ordem	Família	Espécie mais próxima	Número de acesso (GenBank)	Identidade (%)	Diferença/total nucleotídeos
ASPSP 6	<i>S. ruetzleri</i>	Micrococcales	Brevibacteriaceae	<i>Brevibacterium epidermidis</i>	X76565	99,10	13/1438
ASPSP 23	<i>S. ruetzleri</i>			<i>Brevibacterium epidermidis</i>	X76565	99,10	13/1438
ASPSP 100	<i>S. ruetzleri</i>			<i>Brevibacterium epidermidis</i>	X76565	99,10	13/1438
ASPSP 152	<i>S. ruetzleri</i>			<i>Brevibacterium epidermidis</i>	X76565	99,10	13/1438
ASPSP 485	<i>S. ruetzleri</i>			<i>Brevibacterium iodinum</i>	X76567	99,25	10/1330
ASPSP 140	<i>D. oxeata</i>		Intrasporangiaceae	<i>Terrabacter lapilli</i>	AM690744	99,15	12/1416
ASPSP 416	<i>D. oxeata</i>		Microbacteriaceae	<i>Microbacterium oxydans</i>	Y17227	99,85	2/1348
ASPSP 480	<i>D. oxeata</i>			<i>Microbacterium aerolatum</i>	AJ309929	99,39	8/1320
ASPSP 5	<i>S. ruetzleri</i>		Micrococcaceae	<i>Arthrobacter enclensis</i>	JF421614	99,28	10/1397
ASPSP 30	<i>D. oxeata</i>			<i>Kocuria palustris</i>	Y16263	99,86	2/1422
ASPSP 52	<i>S. ruetzleri</i>			<i>Arthrobacter enclensis</i>	JF421614	99,34	9/1368
ASPSP 116	<i>D. oxeata</i>			<i>Arthrobacter rhombi</i>	Y15885	99,93	1/1384
ASPSP 81	<i>D. oxeata</i>	Corynebacteriales	Tsukamurellaceae	<i>Tsukamurella sunchonensis</i>	AF150494	99,77	3/1330
ASPSP 112	<i>D. oxeata</i>			<i>Tsukamurella pulmonis</i>	X92981	99,79	3/1406
ASPSP 141	<i>S. ruetzleri</i>			<i>Tsukamurella pulmonis</i>	X92981	99,79	3/1440
ASPSP 24	<i>S. ruetzleri</i>		Gordoniaceae	<i>Gordonia bronchialis</i>	CP001802	98,74	18/1433
ASPSP 50	<i>S. ruetzleri</i>			<i>Gordonia bronchialis</i>	CP001802	98,74	18/1433
ASPSP 78	<i>D. oxeata</i>	Propionibacteriales	Nocardiodaceae	<i>Nocardiodides plantarum</i>	AF005008	98,59	18/1280
ASPSP 61	<i>S. ruetzleri</i>	Streptomycetales	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces psammoticus</i>	AB184554	99,37	9/1419
ASPSP 62	<i>S. ruetzleri</i>			<i>Streptomyces psammoticus</i>	AB184554	99,72	4/1408
ASPSP 156	<i>S. ruetzleri</i>			<i>Streptomyces psammoticus</i>	AB184554	99,93	1/1419
ASPSP 51	<i>S. ruetzleri</i>	Frankiales	Geodermatophilaceae	<i>Geodermatophilus obscurus</i>	CP001867	98,52	20/1347
ASPSP 40	<i>S. ruetzleri</i>	Pseudonocardiales	Pseudonocardaceae	<i>Saccharopolyspora dendranthema</i>	JQ819260	99,43	8/1415
ASPSP 37	<i>S. ruetzleri</i>	Pseudomonadales	Moraxellaceae	<i>Psychrobacter celer</i>	AY842259	99,43	8/1411
ASPSP 41	<i>S. ruetzleri</i>		Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas songnenensis</i>	JQ762269	98,99	14/1380
ASPSP 444	<i>S. ruetzleri</i>			<i>Pseudomonas songnenensis</i>	JQ762269	99,02	14/1425
ASPSP 128	<i>D. oxeata</i>	Oceanospirillales	Halomonadaceae	<i>Halomonas hydrothermalis</i>	AF212218	100,00	0/1370
ASPSP 149	<i>D. oxeata</i>			<i>Cobetia amphilecti</i>	AB646236	99,93	1/1367

Tabela 3 – Classificação taxonômica de bactérias isoladas das esponjas *Didiscus oxeata* e *Scopalina ruetzleri* (conclusão)

Código do isolado	Origem do isolado	Ordem	Família	Espécie mais próxima	Número de acesso (GenBank)	Identidade (%)	Diferença/total nucleotídeos
ASPSP 419	<i>S.ruetzleri</i>	Oceanospirillales	Halomonadaceae	<i>Cobetia amphilecti</i>	AB646236	100,00	0/1427
ASPSP 424	<i>S.ruetzleri</i>			<i>Cobetia amphilecti</i>	AB646236	99,86	2/1418
ASPSP 443	<i>S.ruetzleri</i>			<i>Cobetia amphilecti</i>	AB646236	100,00	0/1435
ASPSP 488	<i>S.ruetzleri</i>			<i>Cobetia marina</i>	AJ306890	100,00	0/1425
ASPSP 154	<i>D. oxeata</i>	Alteromonadales	Pseudoalteromonadaceae	<i>Pseudoalteromonas issachenkonii</i>	AF316144	99,56	6/1360
ASPSP 442	<i>D. oxeata</i>			<i>Pseudoalteromonas tetraodonis</i>	AF214730	99,92	1/1247
ASPSP 446	<i>D. oxeata</i>			<i>Pseudoalteromonas tetraodonis</i>	AF214730	100,00	0/1326
ASPSP 469	<i>D. oxeata</i>			<i>Pseudoalteromonas tetraodonis</i>	AF214730	99,92	1/1306
ASPSP 457	<i>D. oxeata</i>		Shewanellaceae	<i>Shewanella fidelis</i>	AF420312	98,67	19/1430
ASPSP 15	<i>D. oxeata</i>	Aeromonadales	Aeromonadaceae	<i>Oceanimonas smirnovii</i>	AY538714	99,24	11/1451
ASPSP 428	<i>D. oxeata</i>			<i>Oceanimonas smirnovii</i>	AY538714	99,18	12/1460
ASPSP 124	<i>D. oxeata</i>	Vibrionales	Vibrionaceae	<i>Vibrio rumoiensis</i>	AB013297	97,91	28/1339
ASPSP 456	<i>D. oxeata</i>			<i>Vibrio neocaledonicus</i>	JQ934828	99,70	4/1343
ASPSP 462	<i>D. oxeata</i>			<i>Vibrio mytili</i>	JXOK01000072	99,61	5/1272
ASPSP 126	<i>S.ruetzleri</i>	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Pantoea eucrina</i>	EU216736	100,00	0/1322
ASPSP 34	<i>S.ruetzleri</i>	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	JALV01000036	99,52	7/1461
ASPSP 73	<i>D. oxeata</i>	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	<i>Sulfitobacter delicatus</i>	AY180103	98,42	20/1269
ASPSP 480	<i>D. oxeata</i>			<i>Paracoccus caeni</i>	GQ250442	98,24	23/1304
ASPSP 87	<i>D. oxeata</i>	Burkholderiales	Alcaligenaceae	<i>Achromobacter insuavis</i>	HF586506	99,78	3/1372
ASPSP 17	<i>S. ruetzleri</i>	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus siamensis</i>	AJVF01000043	99,93	1/1467
ASPSP 39	<i>S. ruetzleri</i>			<i>Bacillus licheniformis</i>	AE017333	98,66	18/1344
ASPSP 47	<i>D. oxeata</i>			<i>Bacillus siamensis</i>	AJVF01000043	99,93	1/1467
ASPSP 426	<i>S.ruetzleri</i>			<i>Bacillus toyonensis</i>	CP006863	99,80	3/1466
ASPSP 434	<i>S.ruetzleri</i>			<i>Bacillus aerophilus</i>	AJ831844	99,86	2/1466
ASPSP 474	<i>D. oxeata</i>			<i>Bacillus siamensis</i>	AJVF01000043	99,93	1/1467
ASPSP 486	<i>S. ruetzleri</i>			<i>Bacillus siamensis</i>	AJVF01000043	99,93	1/1467
ASPSP 472	<i>S. ruetzleri</i>		Paenibacillaceae	<i>Brevibacillus agri</i>	D78454	99,12	12/1363
ASPSP 12	<i>D. oxeata</i>	Lactobacillales	Carnobacteriaceae	<i>Carnobacterium divergens</i>	JQLO01000001	99,93	1/1395

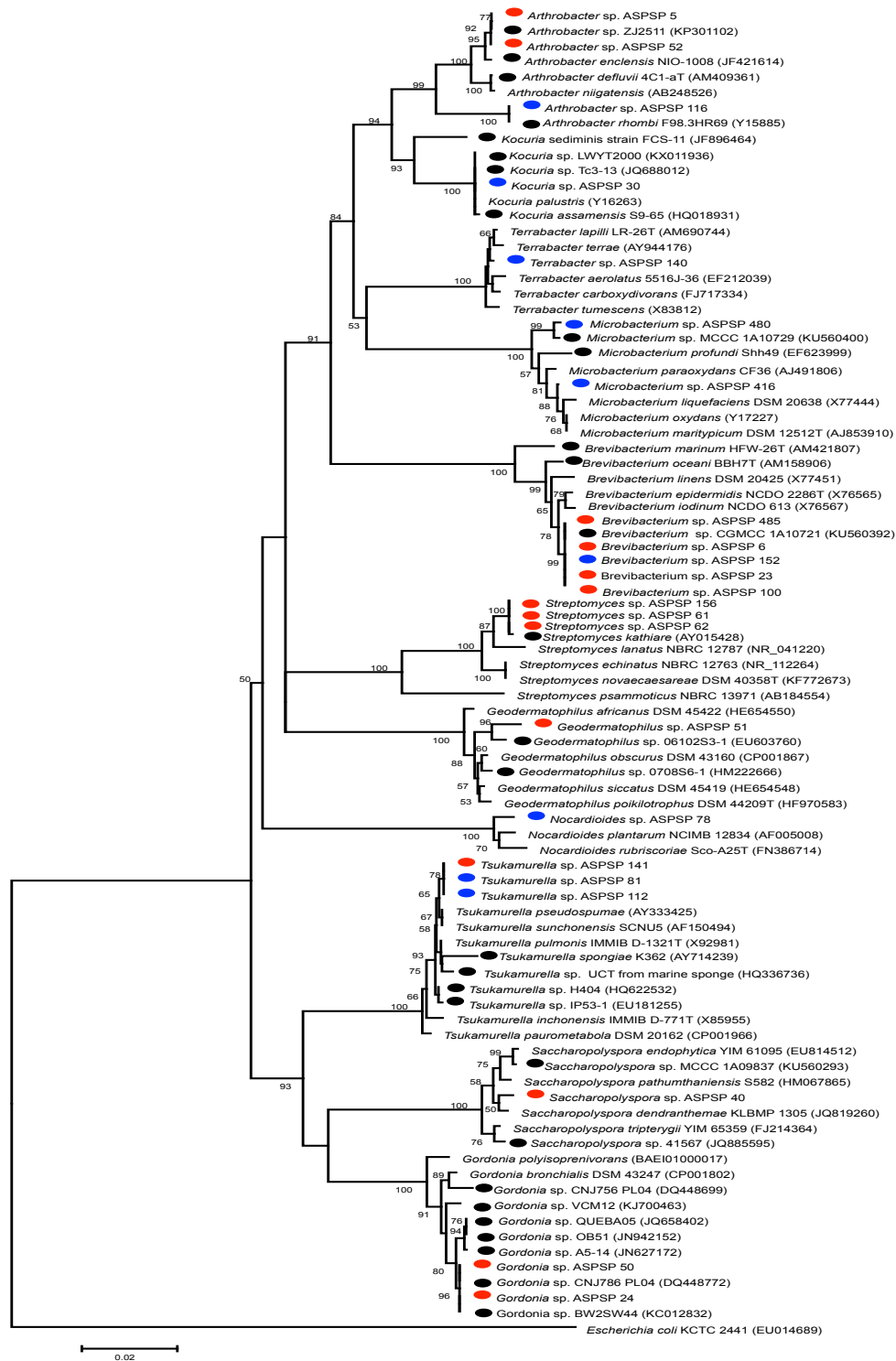
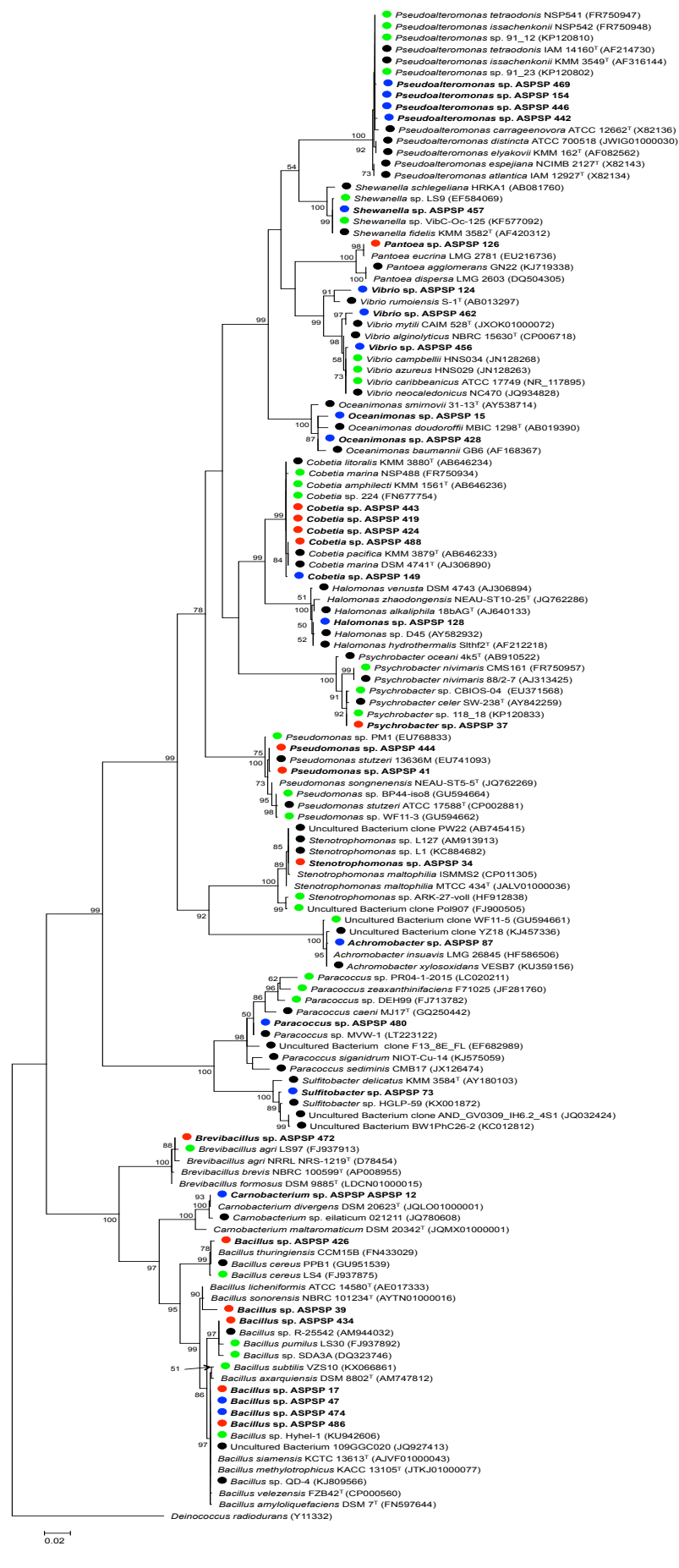


Figura 15 – Análise filogenética de sequências parciais do gene 16S rRNA para linhagens pertencentes ao filo Actinobacteria. O método de Neighbor-Joining foi utilizado para a inferência filogenética. Círculos vermelhos e azuis representam linhagens isoladas das esponjas *S. ruetzleri* e *D. oxeata*, respectivamente. Círculos em preto representam linhagens isoladas de ambientes aquáticos depositadas no GenBank. Os valores de reamostragem acima de 50 % são apresentados em cada nó

Figura 16 – Análise filogenética de sequências parciais do gene 16S rRNA para linhagens pertencentes aos filos Proteobacteria e Firmicutes. O método de máxima verossimilhança foi utilizado para a inferência filogenética. Círculos vermelhos e azuis representam linhagens isoladas das esponjas *S. ruetzleri* e *D. oxeata*, respectivamente. Círculos em preto representam sequências retiradas do GenBank, as quais foram detectadas em ambientes aquáticos, enquanto círculos verdes representam sequências detectadas em invertebrados marinhos (esponjas, corais ou moluscos). Os valores de reamostragem acima de 50 % são apresentados em cada nó



Ainda, as análises filogenéticas (Figuras 15 e 16) indicaram que as bactérias cultivadas foram, em sua maioria, já isoladas ou detectadas em invertebrados marinhos, ou então, relacionadas a fontes ambientais (sedimentos ou água do mar). Apenas as linhagens classificadas como *Terrabacter* sp., *Nocardioides* sp., *Tsukamurella* sp., *Saccharopolyspora* sp. e *Pantoea* sp. não foram tão filogeneticamente próximas a estes padrões de agrupamentos descritos acima. No entanto, consultas realizadas na literatura confirmam que bactérias destes gêneros são frequentemente isoladas do ambiente marinho, incluindo em associações com esponjas (PIMENTEL-ELARDO et al., 2008; PÉREZ et al., 2009; MENEZES et al., 2010; TABARES et al., 2011; SUN et al., 2015; SILVA, 2015). Dessa forma, estes isolados cultivados podem representar novas linhagens encontradas em associação com esponjas, sendo, portanto, necessário uma caracterização fenotípica e genotípica mais abrangente para confirmar o posicionamento taxonômico destas bactérias. Por exemplo, para nosso conhecimento nenhuma espécie nova isolada do ambiente marinho foi descrita para o gênero *Terrabacter*.

5.3.3 Análise da riqueza e diversidade de bactérias por abordagem independente de cultivo

O número de UTOs observadas diferiu significativamente entre esponjas e água do mar (número de UTOs variando de 198 a 398 e de 226 a 522, respectivamente; $P < 0,05$). As estimativas de riqueza Chao 1 variaram de 434 a 763 UTOs para esponjas e de 340 a 1.280 UTOs nas amostras de água do mar ($P < 0,05$), sugerindo que uma grande parte da comunidade presente não foi amostrada. Baseado nessas medidas de alfa diversidade, amostras da água do mar apresentaram maior riqueza de espécies, seguido pelas amostras de *D. oxeata* e *S. ruetzleri* (Figura 17). Os índices de Shannon-Wiener e Simpson confirmaram que a maior diversidade bacteriana foi encontrada em uma amostra de *D. oxeata*, porém, a comunidade bacteriana na água do mar, a qual conteve muitas UTOs presentes em relativamente baixa abundância, apresentaram índices de diversidade comparáveis com os índices encontrados em *D. oxeata*. Em contraste, menor índice de diversidade foi observado em amostras de *S. ruetzleri*.

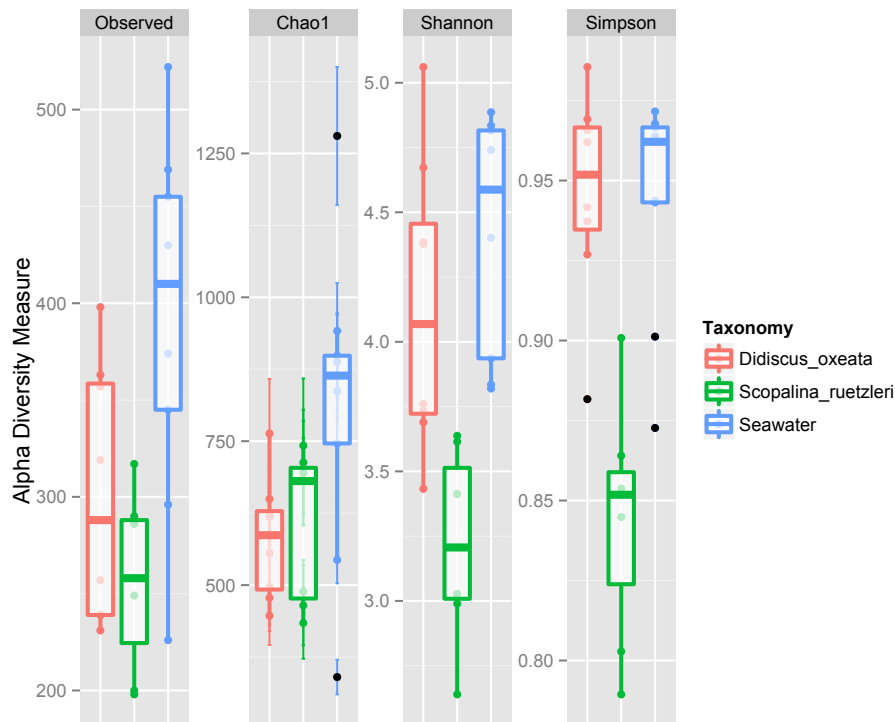


Figura 17 – Medidas de alfa diversidade bacteriana obtidas para amostras das esponjas hospedeiras e água do mar. A elaboração da figura e os cálculos foram realizados usando o programa R carregado com o pacote de *software* Phyloseq

5.3.4 Caracterização da comunidade bacteriana em nível de UTOs

Estes animais apresentaram marcantes diferenças na composição da comunidade bacteriana, como observado na Figura 18. As classificações taxonômicas revelaram vinte e seis filós, incluindo candidatos a filo, os quais foram detectados nas duas esponjas. Os filós Acidobacteria, Actinobacteria, Chloroflexi e Gemmatimonadetes foram mais abundantes e diversos em *D. oxeata*, correspondendo, em média, para mais de 70% das sequências analisadas. Em contraste, Proteobacteria foi altamente abundante em *S. ruetzleri* (em média 89% das sequências) e principalmente enriquecida com Alpha- e Gammaproteobacteria.

Em adição, vinte e três filós bacterianos, incluindo candidatos a filo foram detectados nas amostras de água do mar. O perfil bacteriano detectado na água do mar foi semelhante aquele encontrado em *S. ruetzleri*, com mais de 80% das sequências analisadas consistindo de diferentes linhagens taxonômicas classificadas nas classes Alpha- e Gammaproteobacteria.

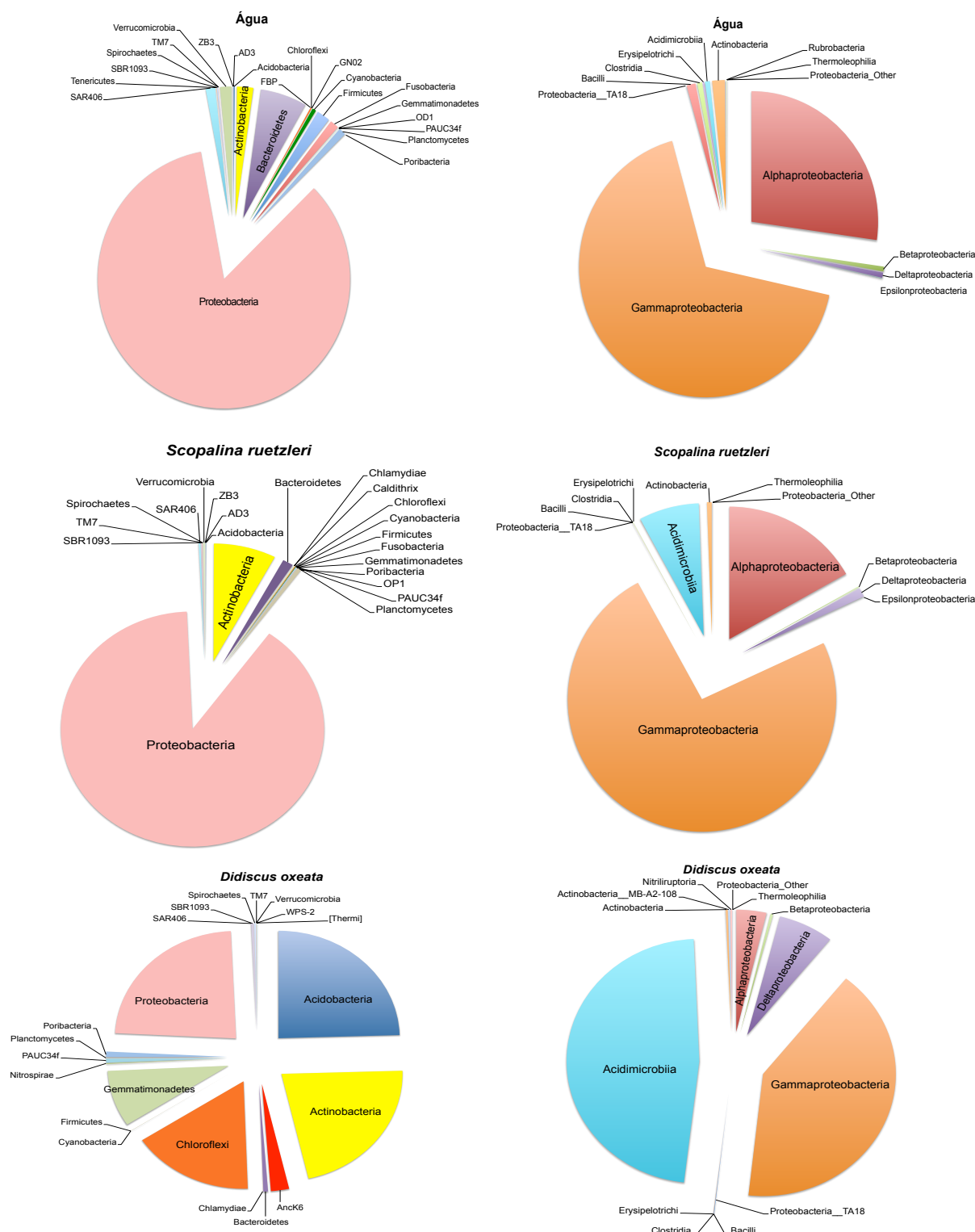


Figura 18 - Classificações taxonômicas nos níveis de filo e classe mostrando a abundância relativa de sequências do gene 16S rRNA detectadas em *S. ruetzleri*, *D. oxeata* e amostras da água do mar. O gráfico representa a contribuição de grupos bacterianos após a média para cada habitat

Para investigar o quão seletiva é a comunidade bacteriana associada à esponjas foram realizadas comparações com as comunidades detectadas na água do mar, utilizando a análise de escalonamento multidimensional (nMDS) e diagramas de Venn. As análises mostraram que as duas espécies de esponjas abrigaram distintas comunidades bacterianas, as quais também diferiram daquelas encontradas na coluna d'água (Figura 19). Ainda, as comparações aos pares (ANOSIM) dos perfis de UTOs revelaram significantes diferenças ($P < 0,001$) entre as comunidades bacterianas em cada espécie de esponja e água do mar, confirmando os padrões visualizados no nMDS. O diagrama de Venn adicionou mais evidência sobre a especificidade das comunidades bacterianas, com cada esponja hospedeira abrigando muitas UTOs exclusivas (1.330 UTOs em *D. oxeata* e 416 UTOs em *S. ruetzleri*). Adicionalmente, foram observadas 161 UTOs compartilhadas entre as duas esponjas, 87 UTOs entre *D. oxeata* e água do mar e 640 UTOs entre *S. ruetzleri* e água do mar. Um total de 98 UTOs foram reveladas em todas as comparações (amostras das duas esponjas e amostras da água do mar).

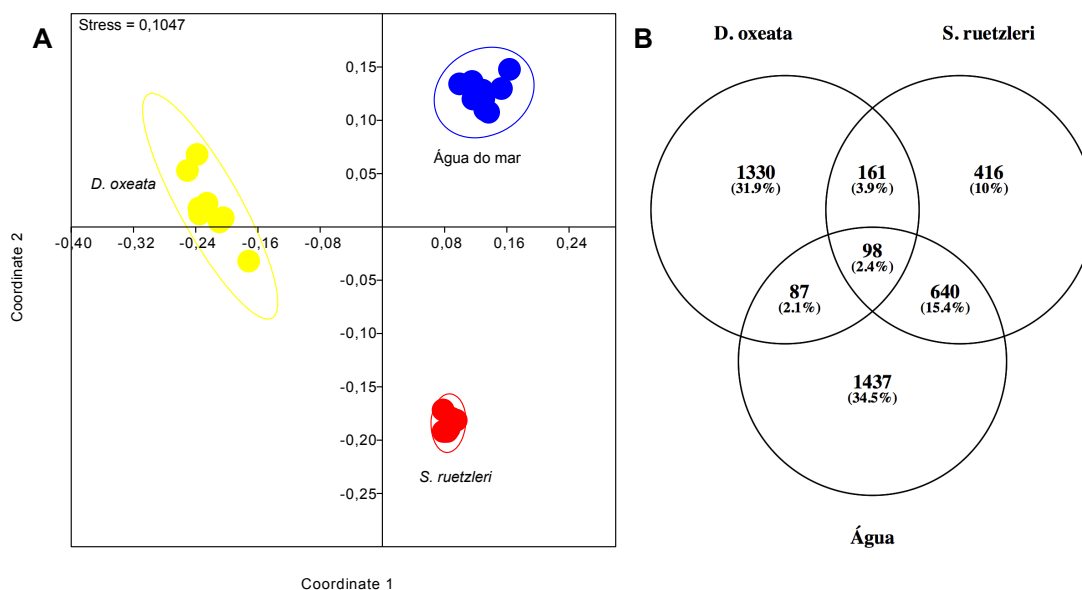


Figura 19 - (A) Escalonamento multidimensional não métrico (nMDS) da estrutura da comunidade bacteriana de amostras de *D. oxeata*, representada em círculos amarelos; *S. ruetzleri*, em vermelho; e água do mar, em azul. A ordenação nMDS foi baseada na medida de dissimilaridade Bray-Curtis. (B) Diagramas de Venn mostrando o número de UTOs compartilhadas e exclusivas de um total de 4.169 UTOs detectadas em todo o conjunto de dados

Devido ao tamanho da nossa amostragem foi possível realizar uma análise das comunidades estáveis habitando estes animais. Sendo assim, uma reduzida comunidade *core* foi detectada em cada esponja, com 96 UTOs presentes em todas as amostras de *S. ruetzleri* e 41 UTOs presentes em *D. oxeata*. Apesar de uma reduzida comunidade *core*, detectada em esponjas, as múltiplas amostras de esponjas exibiram comunidades bacterianas homogêneas em nível de filo (dados não mostrados). Além disso, como esperado, esta comunidade *core* foi muito diferente entre as espécies de esponjas e representada por UTOs abundantes. A complexidade da comunidade em *D. oxeata* ficou ainda mais evidente, quando considerada a abundância absoluta de grupos dominantes (Figura 20).

Em geral, as análises moleculares de riqueza, diversidade e composição bacteriana confirmaram a classificação das esponjas em alta abundância microbiana (AAM-*D. oxeata*) e baixa abundância microbiana (BAM-*S. ruetzleri*). Esta observação está de acordo com estudos prévios que analisaram o perfil da microbiota associada

a essas mesmas espécies de esponjas amostradas em diferentes locais (POPPELL et al., 2013; GLOECKNER et al., 2014; RUA et al., 2015).

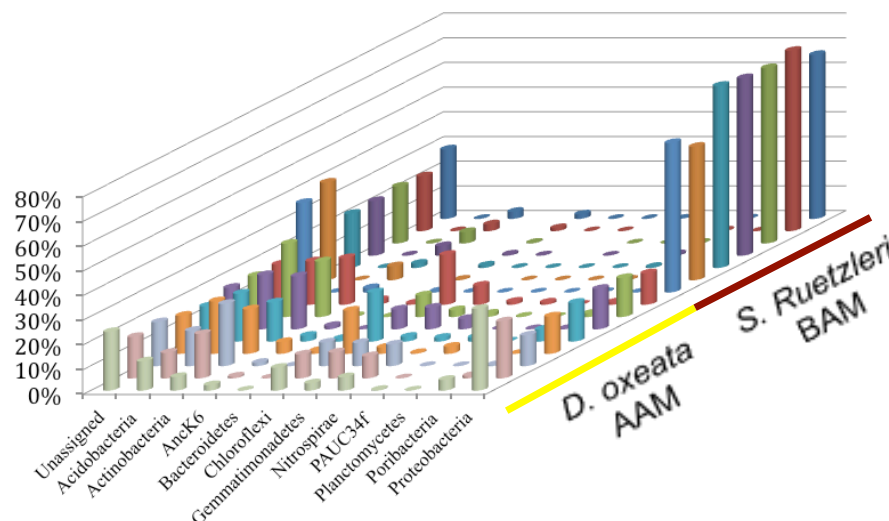


Figura 20 - Diferença entre grupos bacterianos dominantes para os espécimes das esponjas *D. oxeata* e *S. ruetzleri*. Comparações entre as duas espécies de esponjas revelaram onze grupos bacterianos diferencialmente dominantes entre esponjas de AAM e BAM

5.3.5 Sobreposição da comunidade bacteriana por análise dependente e independente de cultivo

Todos os filos bacterianos cultivados (Actinobacteria, Firmicutes e Proteobacteria) foram também detectados no sequenciamento usando a plataforma Ion torrent. Com exceção da família Streptomycetaceae, seis grupos bacterianos pertencentes ao filo Actinobacteria foram também detectados na análise independente de cultivo e classificados nas famílias: Microbacteriaceae (*Microbacterium*), Intrasporangiaceae, Geodermatophilaceae (*Geodermatophilus*), Gordoniaceae (*Gordonia*), Micrococcaceae (*Arthrobacter* e *Kocuria*) e Pseudonocardiaceae.

Embora diversos grupos bacterianos foram classificados no filo Firmicutes, as UTOs mais abundantes foram afiliadas para a família Bacillaceae e representadas principalmente por UTOs pertencentes ao gênero *Bacillus*. No entanto,

representantes das famílias Paenibacillaceae e Carnobacteriaceae não foram detectadas na análise independente de cultivo.

No filo Proteobacteria, as classes Alpha-, Beta- e Gammaproteobacteria foram detectadas em ambas as análises dependentes e independentes de cultivo e classificadas nas famílias: Rhodobacteraceae (Alphaproteobacteria), Alcaligenaceae (Betaproteobacteria), Enterobacteriaceae, Moraxellaceae (*Psychrobacter*), Pseudomonadaceae (*Pseudomonas*), Pseudoalteromonadaceae (*Pseudoalteromonas*), Halomonadaceae (*Cobetia* e *Halomonas*), Aeromonadaceae (*Oceanimonas*), Shewanellaceae (*Shewanella*), Vibrionaceae (*Vibrio*) e Xanthomonadaceae. Contudo, estas UTOs foram principalmente detectadas em amostras da água do mar, uma vez que nos espécimes de esponjas estas UTOs foram encontradas relativamente em baixo número de sequências.

5.4 Discussão

A sistemática do filo Porifera é muito complexa, devido, principalmente, à alta plasticidade de caracteres morfológicos que são utilizados para inferência filogenética (ERPENBECK et al., 2006). Este fato tem levado a algumas falsas interpretações taxonômicas (CHOMBARD et al., 1998; MCCORMACK et al., 2002). Contudo, desde a implementação de ferramentas moleculares a identificação de diversos membros do filo se tornou mais fiel e dinâmica (ERPENBECK et al., 2002; MORROW; CÁRDENAS, 2015; VARGAS et al., 2015). Esta iniciativa foi inicialmente denominada *Sponge Barcoding Project* (SBP) e contempla um amplo banco de dados construído com base em um fragmento padrão de 640 pb de comprimento do gene mitocondrial CO1 (WÖRHEIDE et al., 2007).

Neste trabalho, foi confirmado que as esponjas coletadas no ASPSP são geneticamente relacionadas para espécies encontradas no mar do Caribe. No entanto, há uma limitação de sequências mtCO1 de *D. oxeata* para inferência filogenética (Figura 14). Isto ocorre devido ao fragmento mtCO1 disponível no GenBank ter sido amplificado em uma região do gene após o fragmento padrão estabelecido pelo programa SBP, o que inviabiliza estudos da sistemática de esponjas. Portanto, este estudo adiciona para os bancos de dados fragmentos de aproximadamente 1.000 pb de comprimento do gene mtCO1, os quais podem

auxiliar pesquisadores da área de biologia de esponjas a entender relações evolutivas dentro da subclasse Heteroscleromorpha. Além disso, a identificação molecular dos espécimes pode permitir comparações com amostras coletadas em distintas regiões geográficas, o que viabiliza, por exemplo, estudos de genética de populações e interpretações evolutivas, incluindo a análise de simbiontes em diferentes linhagens filogenéticas dessas espécies de esponja (MONTALVO; HILL, 2011; HARDOIM; COSTA 2014).

Ao analisar as comunidades bacterianas detectadas nas esponjas foi evidente que os hospedeiros *D. oxeata* e *S. ruetzleri* possuem diferentes comunidades de simbiontes (Figura 18), as quais são altamente específicas para seus hospedeiros (Figura 19). Esta diferença não ocorre apenas na composição da comunidade, mas também na diversidade bacteriana, com *D. oxeata* apresentando comunidades de simbiontes mais diversas (Figura 17). Além disso, a riqueza bacteriana em *D. oxeata* foi maior do que em *S. ruetzleri* e o número de UTOs observadas está de acordo com a gama observada para outras espécies de esponjas (JACKSON et al., 2012; SCHMITT et al., 2012; CUVELIER et al., 2014; MOITINHO-SILVA et al., 2014). Em particular, um máximo de 364 diferentes UTOs foi detectado em um estudo avaliando 32 espécies de esponjas coletadas em oito diferentes localizações no mundo (SCHMITT et al., 2012).

Contudo, um maior número de UTOs foi observado na água do mar do que em esponjas. A maior riqueza de UTOs em amostras da água do mar não é surpreendente e tem sido descrita (CUVELIER et al., 2014; HARDOIM et al., 2014; MOITINHO-SILVA et al., 2014; RIBES et al., 2015). Em contraste para nossos resultados, alguns estudos têm demonstrado maior riqueza e diversidade bacteriana em esponjas (WEBSTER et al., 2010; LEE et al., 2011; HARDOIM et al., 2012). Os autores citados acima sugerem que os tecidos de esponjas fornecem um micro-ambiente específico que possibilita uma alta abundância e estabilidade de grupos bacterianos. Recentemente, um exame global revelou que esponjas são os maiores contribuidores para a diversidade microbiana encontrada nos oceanos (THOMAS et al., 2016).

Em estudo prévio, foi observado que muitos microrganismos identificados em *S. ruetzleri* deve não fazer parte da comunidade estável associada a este animal. De fato, as UTOs detectadas por Rua et al. (2015) variaram muito entre os espécimes. Em contraste, nossas múltiplas amostras de cada espécie de esponja apresentaram

um perfil bacteriano similar, a qual levanta a hipótese que tanto *S. ruetzleri* quanto *D. oxeata* abrigam estáveis comunidades bacterianas. Ao comparar as comunidades bacterianas detectadas neste estudo com aquelas detectadas por Rua et al. (2015) foi observado que embora há diferenças nos perfis das comunidades bacterianas (abundância dos grupos), em geral, os mesmos grupos bacterianos foram detectados. Provavelmente, as diferentes abordagens de sequenciamento (shotgun vs PCR do gene 16S rRNA) e sistemas de classificações das sequências podem ser os responsáveis por esta discrepância na abundância dos grupos identificados. Além do mais, é conhecido que técnicas de PCR podem não ser sustentáveis para inferir a abundância bacteriana, uma vez que ocorrem diferentes números de cópias do gene 16S rRNA em distintos grupos bacterianos.

O uso de abordagens independentes de cultivo para analisar comunidades tem resultado em uma maior abundância de UTOs relacionadas a grupos bacterianos ainda não cultivados, tais como Chloroflexi, Acidobacteria, Gemmatimonadetes e Acidimicrobiia (JACKSON et al., 2012; SCHMITT et al., 2012; HARDOIM et al., 2014; ESTEVES et al., 2016; THOMAS et al., 2016). Por outro lado, métodos baseados no cultivo descrevem comunidades dominadas por Proteobacteria, Firmicutes e Actinimycetales (LI, 2009; JACKSON et al., 2012; WEBSTER; TAYLOR, 2012; MONTALVO et al., 2014; SUN et al., 2015; SILVA, 2015). Como esperado, as bactérias cultivadas foram classificadas dentro dos filos Actinobacteria, Firmicutes e Proteobacteria. Membros destes grupos, tais como as linhagens cultivadas neste estudo, (*Streptomyces*, *Saccharopolyspora*, *Kocuria*, *Nocardioides*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Micrabacterium*, *Paracoccus* e *Stenotrophomonas*), são constantemente isolados de esponjas e têm sido reconhecidos como uma fonte rica de substâncias bioativas que podem ser benéficas para a manutenção da saúde do hospedeiro (HENTSCHEL et al., 2001; ROMANENKO et al., 2008; LI et al., 2009; SANTOS et al., 2010, 2015; TABARES et al., 2011; VICENTE et al., 2013; MANIKANDAN et al., 2014; SILVA, 2015; GRAÇA et al., 2015; INDRANINGRAT et al., 2016). Em contraste, bactérias do gênero *Vibrio* são abundantes no ambiente marinho e estudos sugerem que estes microrganismos são potencialmente patogênicos a muitos animais marinhos (THOMPSON et al., 2004; HALDAR et al., 2011).

Em geral, todas as famílias bacterianas isoladas no cultivo e pertencentes ao filo Proteobacteria foram representadas no sequenciamento usando a plataforma Ion

torrent. Contudo, esse não foi o caso para os isolados dos filos Actinobacteria e Firmicutes, onde apenas as famílias Streptomycetaceae (Actinobacteria), Paenibacillaceae e Carnobacteriaceae (Firmicutes) não foram detectados com a abordagem independente de cultivo. Embora seja bem conhecido que uma grande parte da microbiota de esponjas não é acessada utilizando métodos tradicionais de cultivo, também se sabe que parte das bactérias cultivadas não são detectadas em abordagens independentes de cultivo (JACKSON et al., 2012; HARDOIM et al., 2014; MONTALVO et al., 2014). Em particular, no estudo desenvolvido por Hardoim et al. (2014) foi observado que mais de 50% das linhagens cultivadas de esponjas não foram detectadas nas análises independente de cultivo usando a plataforma de pirosequenciamento.

Recentemente, tem sido sugerido que este fenômeno ocorre devido à baixa abundância de alguns grupos bacterianos nos tecidos do hospedeiro (ESTEVES et al., 2016). Contudo, acredita-se que os meios de cultivo utilizados podem favorecer o enriquecimento de filotipos bacterianos encontrados em baixa abundância na comunidade de esponjas, permitindo o seu isolamento (HARDOIM et al., 2014; MONTALVO et al., 2014). No entanto, deve ser aqui destacado que a abordagem de sequenciamento utilizada neste estudo não representou toda a diversidade bacteriana das amostras, sendo possível que mais UTOs sejam detectadas utilizando um maior esforço de sequenciamento.

Em conclusão, as análises dependentes e independentes de cultivo têm fornecido uma descrição detalhada dos grupos bacterianos associados às esponjas. As diferenças nos perfis das comunidades foram observadas e revelaram que a maior parte das bactérias associadas às esponjas são específicas a cada hospedeiro, pois muitas das UTOs detectadas nas esponjas não foram presentes na água do mar. Isto foi também demonstrado em outros estudos que compararam as comunidades bacterianas em esponjas e água do mar (HARDOIM et al., 2012; JACKSON et al., 2012). Atualmente, os estudos evidenciam que cada espécie hospedeira abriga sua própria comunidade bacteriana (THOMAS et al., 2016). Apesar deste estudo ter isolado membros raramente detectados em associação com esponjas ou presentes no ambiente marinho, tais como *Terrabacter* sp. e *Geodermatophilus* sp., o método dependente de cultivo favoreceu o isolamento de bactérias que foram detectadas em alta abundância nas análises independentes de cultivo. Além do mais, dado que algumas bactérias cultivadas não foram detectadas

na análise independente de cultivo, é imperativo que estudos da composição bacteriana em esponjas sejam integrados a análises dependentes e independentes de cultivo para obter maiores informações acerca da real composição de simbioses.

Referências

- BLUNT, J.W.; COPP, B.R.; KEYZERS, R.A.; MUNRO, M.H.; PRINSEP, M.R. Marine natural products. **Natural Products Report**, London, v. 32, n. 2, p. 116-211, 2015.
- CAPORASO, J.G.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F.D.; DESANTIS, T.Z.; ANDERSEN, G.L.; KNIGHT, R. PyNASt: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment. **Bioinformatics**, Oxford, v. 26, n. 2, p. 266-267, 2010a.
- CAPORASO, J.G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F.D.; COSTELLO, E.K.; FIERER, N.; PEÑA, A.G.; GOODRICH, J.K.; GORDON, J.I.; HUTTLEY, G.A.; KELLEY, S.T.; KNIGHTS, D.; KOENIG, J.E.; LEY, R.E.; LOZUPONE, C.A.; MCDONALD, D.; MUEGGE, B.D.; PIRRUNG, M.; REEDER, J.; SEVINSKY, J.R.; TURNBAUGH, P.J.; WALTERS, W.A.; WIDMANN, J.; YATSUNENKO, T.; ZANEVELD, J.; KNIGHT, R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**, London, v. 7, p. 335-336, 2010b.
- CHOMBARD, C.; BOURY-ESNAULT, N.; TILLIER, S. Reassessment of homology of morphological characters in tetractinellid sponges based on molecular data. **Systematic Biology**, Washington, v. 47, n. 3, p. 351-366, 1998.
- CUVELIER, M.L.; BLAKE, E.; MULHERON, R.; MCCARTHY, P.J.; BLACKWELDER, P.; THURBER, R.L.V.; LOPEZ, J.V. Two distinct microbial communities revealed in the sponge *Cinachyrella*. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 5, n. 581, 2014.
- EDGAR, R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. **Bioinformatics**, Oxford, v. 26, n. 19, p. 2460-2461, 2010.
- EDGAR, R.C.; HAAS, B.J.; CLEMENTE, J.C.; QUINCE, C.; KNIGHT, R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. **Bioinformatics**, Oxford, v. 27, n. 16, p. 2194-2200, 2011.
- ENTICKNAP, J.J.; KELLY, M.; PERAUD, O.; HILL, R.T. Characterization of a culturable alphaproteobacterial symbiont common to many marine sponges and evidence for vertical transmission via sponge larvae. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 5, p. 3724-3732, 2006.
- ERPENBECK, D.; BREEUWER, J.; VAN DER VELDE, H.; VAN SOEST, R. Unravelling host and symbiont phylogenies of halichondrid sponges (Demospongiae, Porifera) using a mitochondrial marker. **Marine Biology**, Berlin, v. 141, n. 2, p. 377-386, 2002.

ERPENBECK, D.; BREEUWER, J.A.J.; PARRA-VELANDIA, F.J.; VAN SOEST, R.W.M. Speculation with spiculation? Three independent gene fragments and biochemical characters versus morphology in demosponge higher classification. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 38, n. 2, p. 293-305, 2006.

ESTEVEES, A.I.; AMER, N.; NGUYEN, M.; THOMAS, T. Sample processing impacts the viability and cultivability of the sponge microbiome. **Frontiers in microbiology**, Lausanne, v. 7, n. 499, p. 1-19, 2016.

FAN, L.; REYNOLDS, D.; LIU, M.; STARK, M.; KJELLEBERG, S.; WEBSTER, N.S.; THOMAS, T. Functional equivalence and evolutionary convergence in complex communities of microbial sponge symbionts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 109, n. 27, p. 1878-1887, 2012.

FELSENSTEIN J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. **Journal of molecular evolution**, Berlin, v. 17, n. 6, p. 368-376, 1981.

FUERST, J.A. Diversity and biotechnological potential of microorganisms associated with marine sponges. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 98, n. 17, p. 7331-7347, 2014.

GLOECKNER, V.; WEHRL, M.; MOITINHO-SILVA, L.; GERNERT, C.; SCHUPP, P.; PAWLIK, J.R.; LINDQUIST, N.L.; ERPENBECK, D.; WÖRHEIDE, G.; HENTSCHEL, U. The HMA-LMA dichotomy revisited: an electron microscope survey of 56 sponge species. **The Biological Bulletin**, Lancaster, v. 227, n. 1, p. 78-88, 2014.

GRAÇA, A.P.; VIANA, F.; BONDOSO, J.; CORREIA, M.I.; GOMES, L.; HUMANES, M.; REIS, A.; XAVIER, J.R.; GASPAR, H.; LAGE, O.M. The antimicrobial activity of heterotrophic bacteria isolated from the marine sponge *Erylus deficiens* (Astrophorida, Geodiidae). **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 6, n. 389, p.1-14, 2015.

GRAEBER, I.; KAESLER, I.; BORCHERT, M.S.; DIECKMANN, R.; PAPE, T.; LURZ, R.; NIELSEN, P.; DÖHREN, H.; MICHAELIS, W.; SZEWZYK, U. *Spongiibacter marinus* gen. nov., sp. nov., a halophilic marine bacterium isolated from the boreal sponge *Haliclona* sp. 1. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 58, n. 3, p. 585-590, 2008.

HALDAR, S.; CHATTERJEE, S.; SUGIMOTO, N.; DAS, S.; CHOWDHURY, N.; HINENOYA, A.; ASAKURA, M.; YAMASAKI, S. Identification of *Vibrio campbellii* isolated from diseased farm-shrimps from south India and establishment of its pathogenic potential in an Artemia model. **Microbiology**, Reading, v. 157, n. 1, p. 179-188, 2011.

HARDOIM, C.C.; COSTA, R. Microbial communities and bioactive compounds in marine sponges of the family Irciniidae: a review. **Marine Drugs**, Basel, v. 12, n. 10, p. 5089-5122, 2014.

HARDOIM, C.C.; ESTEVES, A.I.; PIRES, F.R.; GONÇALVES, J.M.; COX, C.J.; XAVIER, J.R.; COSTA, R. Phylogenetically and spatially close marine sponges harbour divergent bacterial communities. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 12, p. e53029, 2012.

HARDOIM, C.C.P.; CARDINALE, M.; CÚCIO, A.C.B.; ESTEVES, A.I.S.; BERG, G.; XAVIER, J.R.; COX, C.J.; COSTA, R. Effects of sample handling and cultivation bias on the specificity of bacterial communities in keratose marine sponges. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 5, n. 611, p. 80-94, 2015.

HENTSCHEL, U.; SCHMID, M.; WAGNER, M.; FIESELER, L.; GERNERT, C.; HACKER, J. Isolation and phylogenetic analysis of bacteria with antimicrobial activities from the Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 35, n. 3, p. 305-312, 2001.

INDRANINGRAT, A.A.G.; SMIDT, H.; SIPKEMA, D. Bioprospecting sponge-associated microbes for antimicrobial compounds. **Marine drugs**, Basel, v. 14, n. 5, p. 87, 2016.

JACKSON, S.A.; KENNEDY, J.; MORRISSEY, J.P.; O'GARA, F.; DOBSON, A.D. *Maribacter spongiicola* sp. nov. and *Maribacter vaceletii* sp. nov., isolated from marine sponges, and emended description of the genus *Maribacter*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 65, n. 7, p. 2097-2103, 2015.

JACKSON, S.A.; KENNEDY, J.; MORRISSEY, J.P.; O'GARA, F.; DOBSON, A.D. Pyrosequencing reveals diverse and distinct sponge-specific microbial communities in sponges from a single geographical location in Irish waters. **Microbial Ecology**, New York, v. 64, n. 1, p. 105-116, 2012.

JANG, H.; YANG, S.H.; SEO, H.S.; LEE, J.H.; KIM, S.J.; KWON, K.K. *Amphritea spongiicola* sp. nov., isolated from a marine sponge, and emended description of the genus *Amphritea*. **International journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 65, n. 6, p. 1866-1870, 2015.

JUNG, D.; SEO, E.Y.; EPSTEIN, S.S.; JOUNG, Y.; HAN, J.; PARFENOVA, V.V.; BELYKH, O.I.; GLADKIKH, A.S.; AHN, T.S. Application of a new cultivation technology, I-tip, for studying microbial diversity in freshwater sponges of Lake Baikal, Russia. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 90, n. 2, p. 417-423, 2014.

KAVAMURA, V.N.; TAKETANI, R.G.; LANÇONI, M.D.; ANDREOTE, F.D.; MENDES, R.; MELO, I.S. Water regime influences bulk soil and Rhizosphere of *Cereus jamacaru* bacterial communities in the Brazilian Caatinga biome. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 9, p. e73606, 2013.

KIM, D.; CHUN, J.; SAHIN, N.; HAH, Y.C.; GOODFELLOW, M. Analysis of thermophilic clades within the genus *Streptomyces* by 16S rRNA ribosomal DNA sequence comparisons. **International Journal Systematic Bacteriology**, Ames, v. 46, n. 2, p. 581-587, 1996.

KIM, O.S.; CHO, Y.J.; LEE, K.; YOON, S.H.; KIM, M.; NA, H.; PARK, S.C.; JEON, Y.S.; LEE, J.H.; YI, H.; WON, S.; CHUN, J. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 62, n. 3, p. 716-721, 2012.

LANE, D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (Ed.). **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. Chichester: Wiley, 1991. p. 115–175.

LAPORT, M.S.; SANTOS-GANDELMAN, J.F.; MURICY, G.; GIAMBIAGI-DEMARVAL, M.; GEORGE, I. Antagonistic Interactions among bacteria Isolated from either the same or from different sponges native to the Brazilian coast. **Journal of Marine Science: Research & Development**, Los Angeles, v. 6, n. 2, p. 185-198, 2016.

LAU, S.C.K.; TSOI, M.M.Y.; LI, X.; PLAKHOTNIKOVA, I.; DOBRETISOV, S.; LAU, K.W.K.; WU, M.; WONG, P.K.; PAWLIK, J.R.; QIAN, P.Y. *Winogradskyella poriferorum* sp. nov., a novel member of the family Flavobacteriaceae isolated from a sponge in the Bahamas. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 55, n. 4, p. 1589-1592, 2005.

_____. *Stenothermobacter spongiae* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family Flavobacteriaceae isolated from a marine sponge in the Bahamas, and emended description of *Nonlabens tegetincola*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 56, n. 1, p. 181-185, 2006a.

_____. Description of *Fabibacter halotolerans* gen. nov., sp. nov. and *Roseivirga spongicola* sp. nov., and reclassification of [*Marinicola*] *seohaensis* as *Roseivirga seohaensis* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 56, n. 5, p. 1059-1065, 2006b.

LAVY, A.; KEREN, R.; HABER, M.; SCHWARTZ, I.; ILAN, M. Implementing sponge physiological and genomic information to enhance the diversity of its culturable associated bacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 87, n. 2, p. 486-502, 2014.

LEE, O.O.; TSOI, M.M.; LI, X.; WONG, P.K.; QIAN, P.Y. *Thalassococcus halodurans* gen. nov., sp. nov., a novel halotolerant member of the Roseobacter clade isolated from the marine sponge *Halichondria panicea* at Friday Harbor, USA. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 57, n. 8, p. 1919-1924, 2007.

LEE, O.O.; WANG, Y.; YANG, J.; LAFI, F.F.; AL-SUWAILEM, A.; QIAN, P.Y. Pyrosequencing reveals highly diverse and species-specific microbial communities in sponges from the Red Sea. **The ISME Journal**, London, v. 5, n. 4, p. 650-664, 2011.

LEE, O.O.; LAU, S.C.; TSOI, M.M.; LI, X.; PLAKHOTNIKOVA, I.; DOBRETISOV, S.; WU, M.C.; WONG, P.K.; QIAN, P.Y. *Gillisia myxillae* sp. nov., a novel member of the family Flavobacteriaceae, isolated from the marine sponge *Myxilla incrustans*.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, London, v. 56, n. 8, p. 1795-1799, 2006a.

_____. *Shewanella irciniae* sp. nov., a novel member of the family Shewanellaceae, isolated from the marine sponge *Ircinia dendroides* in the Bay of Villefranche, Mediterranean Sea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 56, n. 12, p. 2871-2877, 2006b.

LI, Z. Advances in marine microbial symbionts in the China Sea and related pharmaceutical metabolites. **Marine Drugs**, Basel, v. 7, n. 2, p. 113-129, 2009.

MANIKANDAN, S.; GANESAPANDIAN, S.; SANGEETHA, N.; KUMARAGURU, A.K. Antimicrobial activity of marine sponges associated some marine bacterial metabolites against multi drug resistance human pathogens. **Research Journal of Microbiology**, New York, v. 9, n. 1, p. 25, 2014.

MCCORMACK, G.P.; ERPENBECK, D.; VAN SOEST, R.W.M. Major discrepancy between phylogenetic hypotheses based on molecular and morphological criteria within the Order Haplosclerida (Phylum Porifera: Class Demospongiae). **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, Berlin, v. 40, n. 4, p. 237-240, 2002.

MCDONALD, D.; PRICE, M.N.; GOODRICH, J.; NAWROCKI, E.P.; DESANTIS, T.Z.; PROBST, A.; ANDERSEN, G.L.; KNIGHT, R.; HUGENHOLTZ, P. An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. **The ISME Journal**, London, v. 6, n. 3, p. 610-618, 2012.

MCMURDIE, P.J.; HOLMES, S. phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. **PloS one**, San Francisco, v. 8, n. 4, p. e61217, 2013.

MENEZES, C.B.; BONUGLI-SANTOS, R.C.; MIQUELETTTO, P.B.; PASSARINI, M.R.; SILVA, C.H.; JUSTO, M.R.; LEAL, R.R.; FANTINATTI-GARBOGGINE, F.; OLIVEIRA, V.M.; BERLINCK, G.S.; SETTE, L.D. Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of São Paulo state, Brazil. **Microbiological Research**, Jena, v. 165, n. 6, p. 466-482, 2010.

MEYER, C.P.; GELLER, J.B.; PAULAY G. Fine scale endemism on coral reefs: Archipelagic differentiation in turbinid gastropods. **Evolution**, Lawrence, v. 59, n. 1, p. 113-125, 2005.

MITRA, S.; MATSUO, Y.; HAGA, T.; YASUMOTO-HIROSE, M.; YOON, J.; KASAI, H.; YOKOTA, A. *Leptobacterium flavescens* gen. nov., sp. nov., a marine member of the family Flavobacteriaceae, isolated from marine sponge and seawater. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 59, n. 2, p. 207-212, 2009.

MOITINHO-SILVA, L.; BAYER, K.; CANNISTRACI, C.V.; GILES, E.C.; RYU, T.; SERIDI, L.; RAVASI, T.; HENTSCHEL, U. Specificity and transcriptional activity of microbiota associated with low and high microbial abundance sponges from the Red Sea. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 23, n. 6, p. 1348-1363, 2014.

MONTALVO, N.F.; HILL, R.T. Sponge-associated bacteria are strictly maintained in two closely related but geographically distant sponge hosts. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, n. 20, p. 7207-7216, 2011.

MONTALVO, N.F.; DAVIS, J.; VICENTE, J.; PITTIGLIO, R.; RAVEL, J.; HILL, R.T. Integration of culture-based and molecular analysis of a complex sponge-associated bacterial community. **PloS One**, San Francisco, v. 9, n. 3, p. e90517, 2014.

MORAES F. **Esponjas das Ilhas Oceânicas Brasileiras**. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2011. 252 p. (Série Livros, 44).

MORROW, C.; CÁRDENAS, P. Proposal for a revised classification of the Demospongiae (Porifera). **Frontiers in Zoology**, London, v. 12, n. 1, p. 1, 2015.

NISHIJIMA, M.; ADACHI, K.; KATSUTA, A.; SHIZURI, Y.; YAMASATO, K. *Endozoicomonas numazuensis* sp. nov., a gammaproteobacterium isolated from marine sponges, and emended description of the genus *Endozoicomonas* Kurahashi and Yokota 2007. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 63, n. 2, p. 709-714, 2013.

PÉREZ, M.; SCHLEISSNER, C.; RODRÍGUEZ, P.; ZUNIGA, P.; BENEDIT, G.; SÁNCHEZ-SANCHO, F.; DE LA CALLE, F. PM070747, a new cytotoxic angucyclinone from the marine-derived *Saccharopolyspora taberi* PEM-06-F23-019B. **The Journal of Antibiotics**, London, v. 62, n. 3, p. 167, 2009.

PIMENTEL-ELARDO, S.M.; TIRO, L.P.; GROZDANOV, L.; HENTSCHEL, U. *Saccharopolyspora cebuensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a Philippine sponge (Porifera). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 58, n. 3, p. 628-632, 2008.

POPPELL, E.; WEISZ, J.; SPICER, L.; MASSARO, A.; HILL, A.; HILL, M. Sponge heterotrophic capacity and bacterial community structure in high- and low-microbial abundance sponges. **Marine Ecology**, Berlin, v. 35, n. 4, p. 414-424, 2013.

REVEILLAUD, J.; MAIGNIEN, L.; EREN, A.M.; HUBER, J.A.; APPRILL, A.; SOGIN, M.L.; VANREUSEL, A. Host-specificity among abundant and rare taxa in the sponge microbiome. **The ISME Journal**, London, v. 8, n. 6, p. 1198-1209, 2014.

RIBES, M.; DZIALLAS, C.; COMA, R.; RIEMANN, L. Microbial diversity and putative diazotrophy in high-and low-microbial-abundance Mediterranean sponges. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 81, n. 17, p. 5683-5693, 2015.

ROMANENKO, L.A.; UCHINO, M.; TANAKA, N.; FROLOVA, G.M.; SLINKINA, N.N.; MIKHAILOV, V.V. Occurrence and antagonistic potential of *Stenotrophomonas* strains isolated from deep-sea invertebrates. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 189, n. 4, p. 337-344, 2008.

ROT, C.; GOLDFARB, I.; ILAN, M.; HUCHON, D. Putative cross-kingdom horizontal gene transfer in sponge (Porifera) mitochondria. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 6, n. 1, p. 71, 2006.

RUA, C.P.; GREGORACCI, G.B.; SANTOS, E.O.; SOARES, A.C.; FRANCINI-FILHO, R.B.; THOMPSON, F. Potential metabolic strategies of widely distributed holobionts in the oceanic archipelago of St Peter and St Paul (Brazil). **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 91, n. 6, p. fiv043, 2015.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, New York, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.

SANTOS, O.C.; PONTES, P.V.; SANTOS, J.F.; MURICY, G.; GIAMBIAGI-DEMARVAL, M.; LAPORT, M.S. Isolation, characterization and phylogeny of sponge-associated bacteria with antimicrobial activities from Brazil. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 161, n. 7, p. 604-612, 2010.

SANTOS, O.C.S.; SOARES, A.R.; MACHADO, F.L.S.; ROMANOS, M.T.V.; MURICY, G.; GIAMBIAGI-DEMARVAL, M.; LAPORT, M.S. Investigation of biotechnological potential of sponge-associated bacteria collected in Brazilian coast. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 60, n. 2, p. 140-147, 2015.

SANTOS-GANDELMAN, J.F.; SANTOS, O.C.; PONTES, P.V.; ANDRADE, C.L.; KORENBLUM, E.; MURICY, G.; GIAMBIAGI-DEMARVAL, M.; LAPORT, M.S. Characterization of cultivable bacteria from Brazilian sponges. **Marine Biotechnology**, New York, v. 15, n. 6, p. 668-676, 2013.

SCHEUERMAYER, M.; GULDER, T.A.; BRINGMANN, G.; HENTSCHEL, U. *Rubritalea marina* gen. nov., sp. nov., a marine representative of the phylum 'Verrucomicrobia', isolated from a sponge (Porifera). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 56, n. 9, p. 2119-2124, 2006.

SCHMITT, S.; TSAI, P.; BELL, J.; FROMONT, J.; ILAN, M.; LINDQUIST, N.; PEREZ, T.; RODRIGO, A.; SCHUPP, P.J.; VACELET, J.; WEBSTER, N.; HENTSCHEL, U.; TAYLOR, M.W. Assessing the complex sponge microbiota: core, variable and species-specific bacterial communities in marine sponges. **The ISME Journal**, London, v. 6, n. 3, p. 564-576, 2012.

SEO, H.S.; KWON, K.K.; YANG, S.H.; LEE, H.S.; BAE, S.S.; LEE, J.H.; KIM, S.J. *Marinoscillum* gen. nov., a member of the family 'Flexibacteraceae', with *Marinoscillum pacificum* sp. nov. from a marine sponge and *Marinoscillum furvescens* nom. rev., comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 59, n. 5, p. 1204-1208, 2009.

SILVA, F.S.P. **Bioprospecção de actinobactérias associadas à esponja marinha *Aplysina fulva*: isolamento, caracterização e produção de compostos bioativos.** 2015. 159 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

SOGIN, M.L.; MORRISON, H.G.; HUBER, J.A.; WELCH, D.M.; HUSE, S.M.; NEAL, P.R.; ARRIETA, J.M.; HERNDL, G.J. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 103, n. 32, p. 12115-12120, 2006.

SUN, W.; ZHANG, F.; HE, L.; KARTHIK, L.; LI, Z. Actinomycetes from the South China Sea sponges: isolation, diversity, and potential for aromatic polyketides discovery. **Frontiers in microbiology**, Lausanne, v. 6, n. 1048, 2015.

TABARES, P.; PIMENTEL-ELARDO, S.; SCHIRMEISTER, T.; HUENIG, T.; HENTSCHEL, U. Anti-protease and immunomodulatory activities of bacteria associated with Caribbean sponges. **Marine biotechnology**, New York, v. 13, n. 5, p. 883-892, 2011.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, New York, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

THOMAS, T.; MOITINHO-SILVA, L.; LURGI, M.; BJÖRK, J.R.; EASSON, C.; ASTUDILLO-GARCÍA, C.; OLSON, J.B.; ERWIN, P.M.; LÓPEZ-LEGENTIL, S.; LUTER, H.; CHAVES-FONNEGRA, A.; COSTA, R.; SCHUPP, P.J.; STEINDLER, L.; ERPENBECK, D.; GILBERT, G.; KNIGHT, R.; ACKERMANN, G.; LOPEZ, J.V.; TAYLOR, M.W.; THACKER, R.W.; MONTOYA, J.M.; HENTSCHEL, U.; WEBSTER, N.S. Diversity, structure and convergent evolution of the global sponge microbiome. **Nature Communications**, London, v. 7, n. 11870, p. 1-12, 2016.

THOMPSON, F.L.; IIDA, T.; SWINGS, J. Biodiversity of vibrios. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 68, n. 3, p. 403-431, 2004.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J.; CLUSTAL, W. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Southampton, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

VARGAS, S.; KELLY, M.; SCHNABEL, K.; MILLS, S.; BOWDEN, D.; WÖRHEIDE, G. Diversity in a cold hot-spot: DNA-barcoding reveals patterns of evolution among Antarctic demosponges (Class Demospongiae, Phylum Porifera). **PloS one**, San Francisco, v. 10, n. 6, p. e0127573, 2015.

VICENTE, J.; STEWART, A.; SONG, B.; HILL, R.T.; WRIGHT, J.L. Biodiversity of actinomycetes associated with Caribbean sponges and their potential for natural product discovery. **Marine Biotechnology**, New York, v. 15, n. 4, p. 413-424, 2013.

VICENTE, J.; STEWART, A.K.; VAN WAGONER, R.M.; ELLIOTT, E.; BOURDELAIS, A.J.; WRIGHT, J.L. Monacyclinones, new angucyclinone metabolites isolated from *Streptomyces* sp. M7_15 associated with the Puerto Rican sponge *Scopalina ruetzleri*. **Marine Drugs**, Basel, v. 13, n. 8, p. 4682-4700, 2015.

WANG Y.; QIAN P-Y. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. **PLoS One**, San Francisco, v. 4, n. 10, p. e7401, 2009.

WEBSTER, N.S.; TAYLOR, M.W. Marine sponges and their microbial symbionts: love and other relationships. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 14, n. 2, p. 335-346, 2012.

WEBSTER, N.S.; TAYLOR, M.W., BEHNAM, F., LÜCKER, S., RATTEI, T., WHALAN, S., HORN, M., WAGNER, M. Deep sequencing reveals exceptional diversity and modes of transmission for bacterial sponge symbionts. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 12, n. 8, p. 2070-2082, 2010.

WÖRHEIDE, G.; ERPENBECK, D.; MENKE, C. The Sponge Barcoding Project: aiding in the identification and description of poriferan taxa. **Porifera Research: Biodiversity, Innovation and Sustainability**, Rio de Janeiro, v. 28, p. 123-128, 2007.

WRIGHT, E.S.; YILMAZ, L.S.; NOGUERA, D.R. DECIPHER, a search-based approach to chimera identification for 16S rRNA sequences. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 78, n. 3, p. 717-725, 2012.

YANG, S.H.; SEO, H.S.; LEE, J.H.; KIM, S.J.; KWON, K.K. *Kiloniella spongiae* sp. nov., isolated from a marine sponge and emended description of the genus *Kiloniella* Wiese et al. 2009 and *Kiloniella laminariae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 65, n. 1, p. 230-234, 2015.

YOON, B.J.; OH, D.C. *Formosa spongicola* sp. nov., isolated from the marine sponge *Hymeniacidon flavia*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, London, v. 61, n. 2, p. 330-333, 2011.

_____. *Spongiibacterium flavum* gen. nov., sp. nov., a member of the family Flavobacteriaceae isolated from the marine sponge *Halichondria oshoro*, and emended descriptions of the genera *Croceitalea* and *Flagellimonas*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, London, v. 62, n. 5, p. 1158-1164, 2012.

YOON, J.; JANG, J.H.; KASAI, H. *Spongiimonas flava* gen. nov., sp. nov., a new member of the family Flavobacteriaceae isolated from an unidentified marine sponge. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 103, n. 3, p. 625-633, 2013.

YOON, J.; ADACHI, K.; KASAI, H.; LEE, M.K. *Spongiivirga citrea* gen. nov., sp. nov., a new marine bacterium of the family Flavobacteriaceae isolated from a marine sponge. **Current Microbiology**, New York, v. 70, n. 1, p. 51-57, 2015.

ZHANG, H.; ZHENG, W.; HUANG, J.; LUO, H.; JIN, Y.; ZHANG, W.; LIU, Z.; HUANG, Y. *Actinoalloteichus hymeniacidonis* sp. nov., an actinomycete isolated from the marine sponge *Hymeniacidon perleve*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 56, n. 10, p. 2309-2312, 2006.

6 *Saccharopolyspora spongiae* sp. nov., UM NOVO ACTINOMYCETE ISOLADO DA ESPONJA MARINHA *Scopalina ruetzleri* (Wiedenmayer, 1977).

“... sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus,
que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá.”

-Aírton Senna

Resumo

A posição taxonômica de um novo actinomicete marinho, linhagem designada ASPSP 40^T, foi determinado usando uma abordagem polifásica. O novo organismo formou uma linha filética distinta na árvore do gene 16S rRNA de *Saccharopolyspora* e tinha propriedades quimiotaxonômicas e morfológicas consistentes com a sua classificação neste gênero. A linhagem ASPSP 40^T apresentou 99,5% de identidade do gene 16S rRNA com a linhagem tipo de *Saccharopolyspora dendranthema* KLBMP 1305^T e também compartilhou semelhanças de 99,3%, 99,2% e 99,0% com *Saccharopolyspora endophytica* YIM 61095^T, *Saccharopolyspora tripterygii* YIM 65359^T e *Saccharopolyspora pathumthaniensis* S582^T, respectivamente. Comparações de identidade de sequências do gene 16S rRNA com outros membros do sub-clado *Saccharopolyspora* foram inferiores a 97%. Os valores de hibridização DNA-DNA entre o isolado ASPSP 40^T e os seus vizinhos filogenéticos mais próximos, nomeadamente *S. dendranthema*, *S. endophytica* e *S. tripterygii* foram 53,5%, 25,8% e 53,2%, respectivamente. O isolado foi também distinguido das linhagens tipo dessas espécies, utilizando uma gama de características fenotípicas. Com base nestes resultados, a linhagem ASPSP 40^T é considerada para representar uma nova espécie do gênero *Saccharopolyspora*, para qual o nome *Saccharopolyspora spongiae* sp. nov. é proposto. A linhagem tipo é ASPSP 40^T (= CMAA 1452^T = DSM 103218^T = NRRL B-65384^T).

Palavras-chave: Taxonomia polifásica; Actinomicete; *Saccharopolyspora spongiae*. sp. nov.; Esponja marinha

Abstract

The taxonomic position of a novel marine actinomicete, designated strain ASPSP 40^T, was determined by using a polyphasic approach. The organism formed a distinct phyletic line in the *Saccharopolyspora* 16S rRNA gene tree and had chemotaxonomic and morphological properties consistent with its classification in this genus. It was found to be closely related to *Saccharopolyspora dendranthema* KLBMP 1305^T (99.5% 16S rRNA gene similarity) and shared similarities of 99.3%, 99.2% and 99.0% with *Saccharopolyspora endophytica* YIM 61095^T, *Saccharopolyspora tripterygii* YIM 65359^T and *Saccharopolyspora pathumthaniensis* S582^T, respectively. The 16S rRNA gene similarities between the isolate and the remaining members of the subclade are lower than 97%. DNA-DNA relatedness values between the isolate and its closest phylogenetic neighbors, namely *S. dendranthema*, *S. endophytica* and *S. tripterygii* were 55.8%, 21.6% and 50.1%, respectively. The isolate was also distinguished from the type strains of these species using a range of phenotypic features. On the basis of these results, strain

ASPSP 40^T is considered to represent a novel species of the genus *Saccharopolyspora*, for which the name *Saccharopolyspora spongiae* sp. nov. is proposed. The type strain is ASPSP 40^T (= CMAA 1452^T = DSM 103218^T = NRRL B-65384^T).

Keywords: Polyphasic taxonomy; Actinomycete; *Saccharopolyspora spongiae* sp. nov.; Marine sponge

6.1 Introdução

O gênero *Saccharopolyspora* pertence à família Pseudonocardiaceae e foi proposto primeiramente por Lacey & Goodfellow (1975) para acomodar um actinomicete de bagaço de cana de açúcar. Este gênero abrange os organismos aeróbicos, gram-positivos, não ácido-resistentes que formam micélio ramificado (KIM; GOODFELLOW, 2015). Em algumas espécies, as hifas permanecem intactas ou são parcialmente transformadas em cadeias de esporos (SINMA et al., 2011). O micélio aéreo, quando presente, se diferencia em cadeias semelhantes a um colar de esporos dentro de uma bainha lisa (KORN-WENDISCH et al., 1989). Os membros deste gênero também são caracterizados pela presença de ácido meso-diaminopimélico na parede celular, arabinose e galactose como os principais açúcares do hidrolisado de toda a célula, os perfis de ácidos graxos são compostos principalmente de cadeias iso- e anteiso-ramificados, apresentam fosfolípidios de padrão III, menaquinonas tetra-hidrogenadas (MK9[H]₄) com nove unidades isopreno, mas falta ácidos micólicos (LECHEVALIER; LECHEVALIER, 1970; EMBLEY et al., 1987). O conteúdo G + C do DNA de membros deste gênero variam de 66-77% (GOODFELLOW et al., 1989).

O gênero *Saccharopolyspora* contém vinte e seis espécies com nomes validamente publicados, dezesseis dos quais, apenas foram identificados nos últimos 10 anos. A maioria destas espécies foram isoladas de amostras de solos (MERTZ; YAO, 1990; ZHOU et al., 1998; LU et al., 2001; YUAN et al., 2008; ZHANG et al., 2008, 2009; DUANGMAL et al., 2010; CHENG et al., 2013; MEKLAT et al., 2014; VADDAVALLI et al., 2014; HAO et al., 2016), lagos salinos (TANG et al., 2009a, 2009b; GUAN et al., 2011; LV et al., 2014) e associações endofíticas (LI et al., 2009; QIN et al., 2008, 2010; ZHANG et al., 2013). Além disso, alguns membros do gênero *Saccharopolyspora* têm sido isolados ou detectados em associações simbióticas com esponjas marinhas (LIU et al., 2005; PÉREZ et al., 2009; MENEZES et al., 2010; TABARES et al., 2011; KARUPPIAH et al., 2015; SUN et al., 2015), mas

estudos taxonômicos polifásicos são raramente reportados. Até o momento, somente uma linhagem isolada da esponja marinha *Haliclona* sp. foi objeto de uma análise taxonômica e, conseqüentemente, descrita como uma nova espécie, nomeada *Saccharopolyspora cebuensis* (PIMENTEL-ELARDO et al., 2008a).

Nos últimos anos, o interesse no gênero *Saccharopolyspora* tem aumentado devido um grande apelo biotecnológico, principalmente, como fonte para a produção de biocompostos únicos (LIU et al., 2005; PIMENTEL-ELARDO et al., 2008b; PÉREZ et al., 2009; KARUPPIAH et al., 2015; SUN et al., 2015). Contudo, apesar da importância científica e econômica, apenas o antibiótico eritromicina e o inseticida espinosina produzidos, respectivamente, por *Saccharopolyspora erythraea* e *Saccharopolyspora spinosa* são comercializados (KIRST, 2010; CHEN et al., 2015).

Durante nossa investigação da diversidade de bactérias associadas à esponjas, uma possível nova espécie de *Saccharopolyspora* foi isolada da esponja marinha *Scopalina ruetzleri*, coletada no ainda pouco explorado, Arquipélago de São Pedro e São Paulo, no Brasil. Este estudo foi realizado para determinar o posicionamento filogenético do isolado ASPSP 40^T. Com base na caracterização por taxonomia polifásica, o actinomycete marinho foi determinado como pertencente a uma nova espécie do gênero *Saccharopolyspora*, ao qual o nome *Saccharopolyspora spongiae* sp. nov. é proposto.

6.2 Material e Métodos

6.2.1 Coleta de amostras, condições de cultivo e manutenção

Amostras de tecidos da esponja marinha *Scopalina ruetzleri* foram coletadas em profundidades entre 15 e 20 m na face leste (0 ° 54'57, 86 "N, 29 ° 20'41, 34" O) do Arquipélago de São Pedro e São Paulo. Fragmentos dos tecidos da esponja foram triturados, diluições seriadas foram realizadas e uma suspensão de 100 µl foi utilizada para o isolamento. A linhagem ASPSP 40^T cresceu em meio ágar M1 (MINCER et al., 2005) feito com água do mar artificial (33 g L⁻¹ Red Sea Salt®, Red Sea, Houston, TX, EUA), suplementado com ciclo-hexamida e nistatina (todos a 25 ng ml⁻¹). O crescimento da linhagem ASPSP 40^T foi realizado a 25 °C durante 6 semanas. O isolado foi mantido em meio ágar ISP 2 a 4 °C (SHIRLING; GOTTLIEB, 1966) e em glicerol 20% (v / v) a -80 °C.

6.2.2 Características fenotípicas

Características fenotípicas da linhagem bacteriana foram observadas após 21 dias em meios de cultivo ISP 2-7, tal como recomendado por Shirling e Gottlieb, (1966) e em meios BDA, Czapek's e ágar nutriente. A ornamentação e arranjo dos esporos foram observados por meio da desidratação da colônia e revestimento em ouro para viabilizar a observação das imagens por técnica de microscopia eletrônica de varredura (Phenom-Mundial, Eindhoven, Holanda) (O'DONNELL et al., 1993). Testes de tolerância a temperatura, pH e NaCl foram verificados usando o meio ISP 2. Os meios e procedimentos utilizados para determinar características fisiológicas e bioquímicas foram aqueles descritos por Kurup e Schmitt (1973), Gordon et al. (1974) e Williams et al. (1989). As atividades enzimáticas foram determinadas utilizando o *kit* comercial API ZYM (bioMérieux), de acordo com as instruções do fabricante.

6.2.3 Quimiotaxonomia

A biomassa para estudos químicos e moleculares foi preparado após crescimento das linhagens em frascos agitados (cerca de 150 rpm), utilizando o meio ISP 2 a 28 °C durante 5 dias. Os procedimentos para a identificação dos aminoácidos da parede celular seguiram aqueles descritos por Stanek & Roberts (1974). Os lipídios polares foram extraídos e identificados usando técnicas cromatográficas como recomendado por Minnikin et al. (1984). Os açúcares presentes na parede celular foram extraídos e determinados por cromatografia de camada delgada (CCD) como recomendado por Hasegawa et al. (1983). Menaquinonas foram extraídas usando os métodos de Minnikin et al. (1984) e separados por HPLC (KROPPESTEDT, 1982). O perfil de ácidos graxos do isolado ASPSP 40^T foi determinado pela análise de FAME, após o crescimento da linhagem em meio de cultura (TSBA; Difco), a 28 °C durante 3 dias. O preparo das amostras foi realizado como proposto por Sasser (1990) e analisados por cromatografia gasosa (Hewlett Packard 6890), os ácidos graxos detectados foram comparados utilizando o sistema de identificação *Sherlock Microbial*, usando o banco de dados ACTINO versão 5. A porcentagem do conteúdo G + C do DNA genômico foi determinado em duplicata com três repetições, como proposto por Gonzalez e Saiz-Jimenez (2002).

6.2.4 Filogenia

A extração do DNA genômico da linhagem ASPSP 40^T, amplificação por PCR e sequenciamento genético do gene 16S rRNA foi realizada seguindo os procedimentos adotados por Kim et al. (1996). A sequência do gene 16S rRNA quase completa (1.486 pb) foi comparada com sequências de linhagens tipo utilizando o servidor EzTaxon-e (KIM et al., 2012). O alinhamento das sequências foi realizado com o programa Clustal W (THOMPSON et al., 1994) usando o software MEGA (TAMURA et al., 2011). Árvores filogenéticas foram inferidas usando os algoritmos Máxima verossimilhança (FELSENSTEIN, 1981), Máxima-Parcimônia (FITCH, 1971) e Neighbor-Joining (SAITOU; NEI, 1987). A matriz de distância evolutiva para a análise Neighbor-Joining foi gerado utilizando o modelo Tamura 3 parâmetros. As topologias das árvores resultantes foram avaliadas por análise de bootstrap (FELSENSTEIN, 1985) com base em 1.000 repetições.

6.2.5 Hibridização DNA-DNA

Ensaio de hibridização genômica de DNA:DNA foram realizados entre o isolado ASPSP 40^T e as respectivas linhagens tipo: *S. dendranthemae* DSM 46699^T, *S. endophytica* DSM 45425^T e *S. tripterigii* DSM 45269^T. Este procedimento foi realizado como prestação de serviço na reconhecida coleção de culturas microbianas DSMZ (Braunschweig, Alemanha). Para esta finalidade, o DNA genômico foi extraído usando um homogeneizador de alta pressão, modelo *Constant Systems* TS 0.75 KW (IUL Instruments, Germany) e purificado por cromatografia em hidroxiapatita como descrito por Cashion et al. (1977). A hibridização DNA:DNA foi realizada como descrito por De Ley et al. (1970), tendo em consideração as modificações descritas por Huss et al. (1983), utilizando um espectrofotômetro UV/VIS modelo Cary 100, equipado com um *Peltier-thermostatted multicell* tamanho 6 x 6 e uma sonda controladora de temperatura (Varian).

6.3 Resultados e Discussão

As propriedades fenotípicas do isolado ASPSP 40^T foram consistentes com as características do gênero *Sccharopolyspora* (KIM; GOODFELLOW, 2015). O

organismo desenvolveu abundante substrato micelial na maioria dos meios de cultivo utilizados, com exceção ao meio ISP 7, o qual não foi sustentável para crescimento da linhagem. Ademais, no meio ISP 3 o isolado apresentou um crescimento muito fraco ou vestigial. Pigmentos solúveis não foram produzidos em qualquer um dos meios de cultivo utilizados. A cor do micélio vegetativo foi amarelo pálido. O micélio aéreo foi branco em meio ISP 2, mas escasso ou ausente na maioria dos meios testados. Ainda, o micélio aéreo formou cadeias lineares de 7-10 esporos, os quais tinham superfícies lisas (Figura 21).

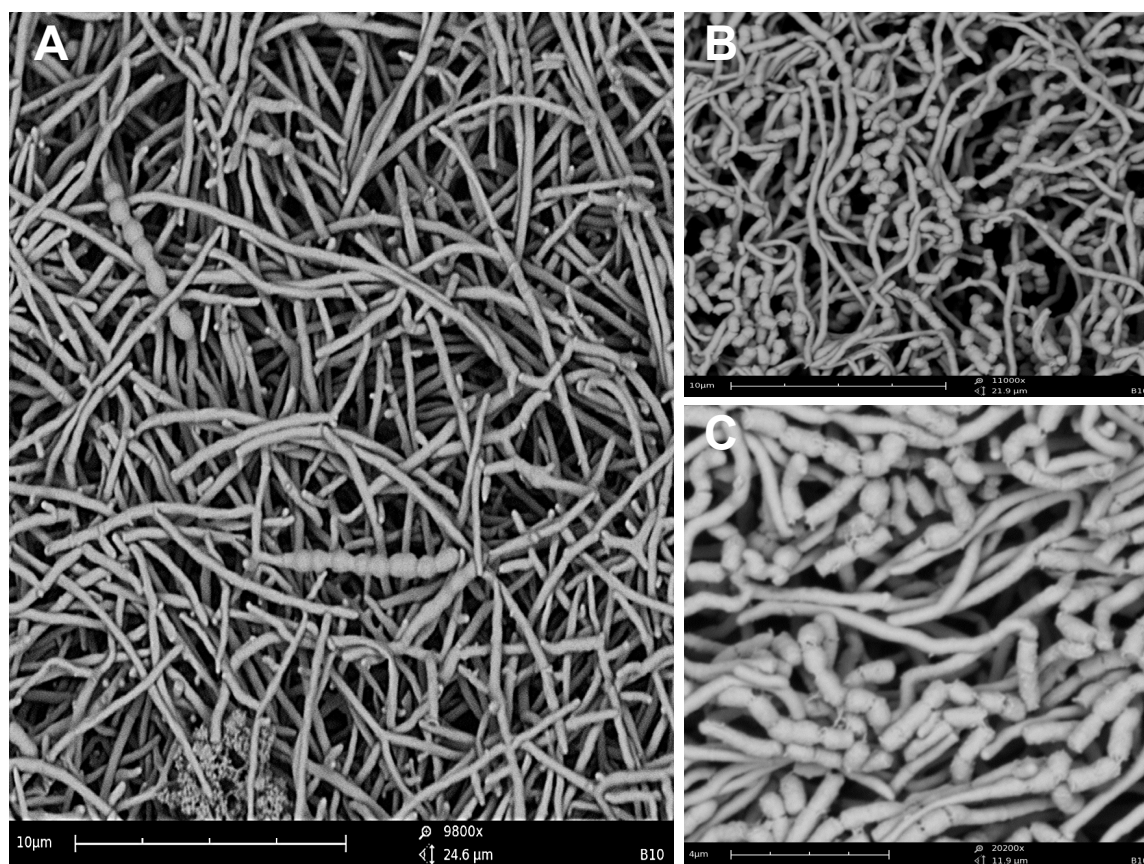


Figura 21 - Eletromicrografia de varredura da linhagem ASPSP 40^T, crescida em meio *International Streptomyces Project* – ISP 2, durante 21 dias a 28 °C. (A) Cadeia linear de esporos e hifas aéreas. (B – C) É mostrado o micélio extensivamente ramificado

A linhagem ASPSP 40^T continha ácido meso-diaminopimélico como o aminoácido diagnóstico no peptidoglicano. Os açúcares celulares predominantes foram arabinose e galactose. Os fosfolípidos detectados após cromatografia foram: difosfatidilglicerol (DPG), fosfatidil-*N*-metanolamina (PME), fosfatidilglicerol (PG),

fosfolipídio colina-positivo (PC), fosfatidilinositol (PI) e um fosfolipídio desconhecido, mas falta ácidos micólicos. Os principais ácidos graxos (> 10%) foram iso-C_{16:0} (26,24%), iso-C_{15:0} (20,11%), iso-C_{17:0} (13,26%) e anteiso-C_{17:0} (10,65%). Este perfil de ácido graxo foi similar aqueles detectados nas espécies filogeneticamente mais próximas, embora houve diferenças nas proporções de alguns componentes. O sistema quinona predominante foi a MK-9(H₄), contudo foram também detectados menores quantidades das menaquinonas MK-9 (H₂) e MK-9. A constituição do DNA genômico (% G + C) da linhagem ASPSP 40^T foi 64,8 ± 0,1%. Comparações da composição celular da linhagem ASPSP 40^T e outras linhagens tipo de *Saccharopolyspora* é mostrado na Tabela 4.

Tabela 4 – Comparações da composição celular do isolado ASPSP 40^T com espécies relacionadas do gênero *Saccharopolyspora*

Características	Linhagens				
	1	2	3	4	5
Principais ácidos graxos	iso-C _{16:0} (26.2%)	iso-C _{16:0} (25.5%)	iso-C _{15:0} (28.8%)	iso-C _{16:0} (31.3%)	iso-C _{15:0} (25.7%)
	iso-C _{15:0} (20.1%)	anteiso-C _{17:0} (17.1%)	iso-C _{16:0} (22.0%)	anteiso-C _{17:0} (20.3%)	iso-C _{16:0} (18.3%)
	iso-C _{17:0} (13.2%)	anteiso-C _{15:0} (10.3%)	iso-C _{17:0} (12.4%)	iso-C _{15:0} (14.7%)	anteiso-C _{17:0} (17.9%)
	anteiso-C _{17:0} (10.7%)	18:1w7c/18:1w6c (11.1%)	anteiso-C _{17:0} (10.3%)	iso-C _{17:0} (10.2%)	anteiso-C _{15:0} (10.2%)
	C _{16:0} 10-methyl and/or C _{17:1} iso w9c (11.3%)	iso-C _{15:0} (9.2%)	-	C _{16:0} 9 methyl (7%)	-
Fosfolípidios	DPG, PG, PME, PC, PI	DPG, PG, PE, PC, GL, L	DPG, PG, PC, PE, PIM, PI	DPG, PG, PE, PME, PC, PIM, PI, PL	PC, PE
Menaquinonas	MK-9(H ₄), MK- 9(H ₂), MK-9	MK-9(H ₄), MK-9(H ₂)	MK-9(H ₄), MK-9(H ₆)	MK-9(H ₄), MK- 9(H ₂)	MK-9(H ₄)
Conteúdo G+C (mol%)	64.8	68.7	66.2	70.5	70.2

Linhagens: 1, ASPSP 40^T; 2, *S. dendranthemae* KLBMP 1305^T; 3, *S. endophytica* YIM 61095^T; 4, *S. tripterygii* YIM 65359^T; 5, *S. pathumthaniensis* S582^T. Dados para comparações com as outras espécies de referência foram conferidos nos estudos por Zhang et al. (2013); Qin et al. (2008); Li et al. (2009) e Sinma et al. (2011)

Pode ser visto na árvore filogenética usando o algoritmo de Neighbor-Joining (Figura 22) que o isolado ASPSP 40^T formou uma linha filética distinta na árvore do gene 16S rRNA de *Saccharopolyspora*. O isolado foi filogeneticamente relacionado com a linhagem tipo de *Saccharopolyspora dendranthemae* KLBMP 1305^T (99,5% 16S rRNA gene) e também compartilhou identidades de sequências do gene 16S rRNA de 99,3%, 99,2% e 99,0% com as linhagens tipo de *Saccharopolyspora endophytica* YIM 61095^T, *Saccharopolyspora tripterygii* YIM 65359^T e *Saccharopolyspora pathumthaniensis* S582^T, respectivamente. A estreita relação entre a linhagem ASPSP 40^T e a linhagem tipo de *S. dendranthemae* KLBMP 1305^T também foi apoiada por um moderado valor de bootstrap nas árvores de máxima parcimônia e máxima verossimilhança. As comparações de identidade de sequências do gene 16S rRNA com outros membros do sub-clado *Saccharopolyspora* foram inferiores a 97%.

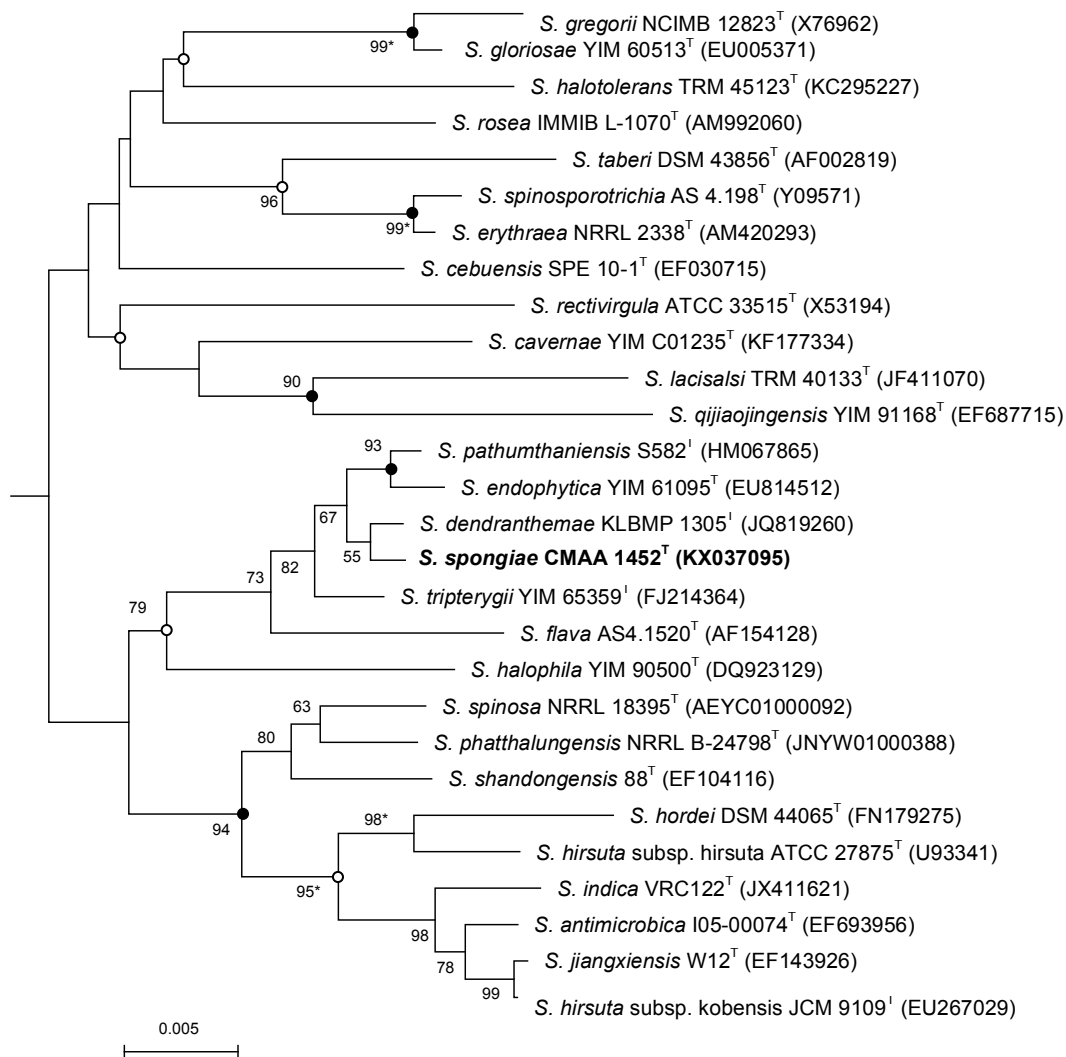


Figura 22 - Árvore Neighbor-Joining mostrando a posição filogenética da linhagem ASPSP 40^T em relação aos membros do gênero *Saccharopolyspora*. A árvore foi baseado numa comparação de ~ 1.415 pb do gene 16S rRNA. Os asteriscos indicam valores de bootstrap também recuperados nas árvores de máxima parcimônia e verossimilhança. Círculos brancos indicam que os nós correspondentes também foram recuperados na árvore de máxima verossimilhança; e círculos pretos indicam nós também recuperados na árvore de máxima parcimônia. Um grande clado contendo os membros do gênero *Amycolatopsis* foi utilizado como grupo externo (não mostrado)

Apesar da alta identidade de sequências do gene 16S rRNA entre a linhagem ASPSP 40^T e seus vizinhos filogenéticos mais próximos, as composições celulares e características fisiológicas foram contrastantes em muitos aspectos, incluindo a utilização de fontes de carbono e nitrogênio (Tabela 5). Em particular, o isolado ASPSP 40^T se distingue de *S. dendranthemae* KLBMP 1305^T, seu parente mais próximo, se baseando em sua habilidade em degradar caseína e aesculina, utilizar D-galactose e sorbitol, mas não dextrina e D-ribose como única fonte de carbono, bem como utilizar L-asparagina, L-histidina, L-lisina, L-serina e L-valina como única fonte de nitrogênio. Além disso, as análises de hibridização DNA-DNA entre o isolado ASPSP 40^T e linhagens tipo de *S. dendranthemae*, *S. endophytica* e *S. tripterygii* foram $53,5 \pm 2,3\%$, $25,8 \pm 4,2\%$ e $53,2 \pm 3,1\%$, respectivamente; valores bem abaixo do ponto de corte de 70% recomendado para a classificação de linhagens bacterianas à mesma espécie genômica (TINDALL et al., 2010). Estes dados de hibridização corroboraram com aqueles encontrados por outros autores (SINMA et al., 2011; ZHANG et al., 2013), nos quais algumas espécies de *Saccharopolyspora* compartilham alta identidade de sequências do gene 16S rRNA com relativamente baixos valores de hibridização DNA:DNA e, portanto, reforça a necessidade de estabelecer abordagens polifásicas para correto posicionamento taxonômico de novas linhagens do gênero *Saccharopolyspora*.

Tabela 5 - Características fisiológicas diferenciais entre a linhagem ASPSP 40^T e espécies de *Saccharopolyspora* filogeneticamente mais próximas

(continua)

Meio	Linhagens				
	1	2	3	4	5
Degradação:					
Caseína	+	-	-	-	+
Quitina	+	nd.	+	-	-
Aesculina	+	-	+	+	+
Adenina	-	nd.	+	+	+
Xantina	+	nd.	+	-	nd.
Hipoxantina	+	nd.	+	nd.	nd.
Amido	+	+	+	-	+
Ureia	-	nd.	-	+	nd.
Tyrosina	+	nd.	+	+	+
Celulose	+	nd.	+	-	-
Xylana	+	nd.	-	-	+
Ácido úrico	+	nd.	-	-	+
Tween 80	+	+	+	-	+
Fonte de Carbono:					
D-arabinose	+	+	-	+	+
L-arabinose	-	nd.	+	+	+
Dextrina	-	+	+	+	+
D-galactose	+	-	+	+	+
D-lactose	-	-	+	+	+
D-maltose	+	nd.	+	+	+
D-mannose	-	-	+	-	-
D-raffinose	-	-	+	-	+
L-rhamnose	+	nd.	+	-	+
D-rhamnose	nd.	+	+	+	-
D-ribose	-	+	+	+	-
D-xilose	-	nd.	+	+	+
Sorbitol	+	-	+	-	-

Tabela 5 - Características fisiológicas diferenciais entre a linhagem ASPSP 40^T e espécies de *Saccharopolyspora* filogeneticamente mais próximas
(conclusão)

Meio	Linhagens				
	1	2	3	4	5
Xylitol	+	+	+	+	-
Produção de ácido:					
D-arabinose	+	+	-	-	w
D-cellobiose	+	-	-	-	+
D-frutose	+	-	-	-	+
D-galactose	+	-	+	+	+
D-maltose	+	-	+	w	+
D-rhamnose	-	-	+	-	-
D-ribose	+	+	-	-	-
Xylose	+	-	+	+	+
Fonte de nitrogênio:					
L-asparagina	+	-	+	-	+
L-Histidina	+	-	-	+	+
L-lysina	+	-	-	+	+
L-ácido glutâmico	-	-	-	+	-
L-serina	+	-	+	+	+
L-valina	+	-	-	-	+

Linhagens: 1, ASPSP 40^T; 2, *S. dendranthemae* KLBMP 1305^T; 3, *S. endophytica* YIM 61095^T; 4, *S. tripterygii* YIM 65359^T; 5, *S. pathumthaniensis* S582^T. Dados para comparações com as outras espécies de referência foram conferidos nos estudos por Zhang et al. (2013); Qin et al. (2008); Li et al. (2009) e Sinma et al. (2011). +, positivo; -, negativo; w, fraco; nd, não determinado

Em geral, os dados das investigações morfológicas, quimiotaxonômicas e as análises filogenéticas suportaram a classificação da linhagem ASPSP 40^T no gênero *Saccharopolyspora*. Entretanto, a linhagem ASPSP 40^T pode ser distinguida de linhagens tipo filogeneticamente mais próximas por diversas características fenotípicas e fisiológicas, bem como por baixos valores de hibridização DNA:DNA. Em conclusão, a linhagem ASPSP 40^T merece ser considerada como uma nova espécie do gênero *Saccharopolyspora*, para qual o nome *Saccharopolyspora*

spongiae sp. nov. é proposto. A linhagem tipo é ASPSP 40^T (=CMAA 1452^T =DSM 103218^T =NRRL B-65384^T).

Descrição de *Saccharopolyspora spongiae* sp. nov.

Saccharopolyspora spongiae (spon'gi.æ. L. gen. n. spongiae de uma esponja, se referindo a fonte de isolamento, uma esponja marinha).

Aeróbica, coloração Gram-positiva, actinomiceto-não-álcool-ácido resistente que forma um substrato de micélio extensivamente ramificado, apresenta hifas aéreas que se diferencia em cadeias curtas, retilíneas a flexíveis, contendo esporos de superfície lisa em meio ISP 2. Pigmentos difusíveis não são produzidos. Cresce em 15 a 30 °C, em faixas de pH 6,0-10,0 e na presença de 0-7% (w/v) de NaCl. Degrada caseína, quitina, esculina, xantina, hipoxantina, amido, tirosina, celulose, xilana, ácido úrico e Tween 80, mas não adenina e ureia. D-arabinose, D-galactose, D-maltose, lactose, L-ramnose, sorbitol e xilitol são usados como únicas fontes de carbono para crescimento e produção de energia, mas não L-arabinose, dextrina, D-lactose, D-manose, D-rafinose, D-ribose e D-xilose (em 1,0% w/v). Produz alcalina fosfatase, ácido fosfatase, naftol-AS-BI-fosfohidrolase, b-galactosidase, a-glucosidase, b-glucosidase, N-acetil-b-glucosaminidase, estearase lipase (C 8), mas não lipase (C 14), leucina arilamidase, valina arilamidase, cistina arilamidase, tripsina, a-quimotripsina, a-galactosidase, b-glucuronidase, a-manosidase e a-fucosidase (testes API ZYM). As propriedades quimiotaxonômicas são típicas do gênero *Saccharopolyspora*. A linhagem tipo, ASPSP 40^T (=CMAA 1452^T =DSM 103218^T =NRRL B-65384^T), foi isolada de esponja marinha, coletada no Arquipélago de São Pedro e São Paulo, no Brasil. A descrição da espécie se baseia numa única linhagem e, portanto, serve como a descrição da linhagem tipo. O número de acesso no GenBank para a sequência do gene 16S rRNA de ASPSP 40^T é KX037095.

Referências

- CASHION, P.; HODLER-FRANKLIN, M.A.; MCCULLY, J.; FRANKLIN, M. A rapid method for base ratio determination of bacterial DNA. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 81, n. 2, p. 461-466, 1977.
- CHEN, J.; XIA, H.; DANG, F.; XU, Q.; LI, W.; QIN, Z. Characterization of the chromosomal integration of *Saccharopolyspora* plasmid pCM32 and its application to improve production of spinosyn in *Saccharopolyspora spinosa*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 99, n. 23, p. 10141-10149, 2015.
- CHENG, J.; ZHANG, Y.-G.; CHEN, W.; LI, L.; ZHANG, D.-F.; WANG, H.-F.; LU, X.-H.; DUAN, Y.-Q.; LI, W.-J. *Saccharopolyspora cavernae* sp. nov., a novel actinomycete isolated from the Swallow Cave in Yunnan, south-west China. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 104, n. 5, p. 837-843, 2013.
- DE LEY, J.; CATTOIR, H.; REYNAERTS, A. The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 12, n. 1, p. 133-142, 1970.
- DUANGMAL, K.; MINGMA, R.; THAMCHAIPENET, A.; MATSUMOTO, A.; TAKAHASHI, Y. *Saccharopolyspora phatthalungensis* sp. nov., isolated from rhizosphere soil of *Hevea brasiliensis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 60, n. 8, p. 1904-1908, 2010.
- EMBLEY, T.M.; WAIT, R.; DOBSON, G.; GOODFELLOW, M. Fatty acid composition in the classification of *Saccharopolyspora hirsuta*. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 41, n. 2, p. 131-135, 1987.
- FELSENSTEIN, J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. **Journal of molecular evolution**, Berlin, v. 17, n. 6, p. 368-376, 1981.
- _____. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, Lawrence, v. 39, n. 4, p. 783-791, 1985.
- FITCH, W.M. Towards defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. **Systematic Biology**, Washington, v. 20, n. 4, p. 406-416, 1971.
- GONZALEZ, J.M.; SAIZ-JIMENEZ, C. A fluorimetric estimation of G+C mol% content in microorganisms by thermal denaturation temperature. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 4, n. 11, p. 770-773, 2002.
- GOODFELLOW, M.; LACEY, J.; ATHALYE, M.; EMBLEY, T.M.; BOWEN, T. *Saccharopolyspora gregorii* and *Saccharopolyspora hordei*: two new actinomycete species from fodder. **Journal of General Microbiology**, London, v. 135, p. 2125-2139, 1989.

GORDON, R.E.; BARNETT, D.A.; HANDERHAN, J.E.; PANG, CH-N. *Nocardia coeliaca*, *Nocardia autotrophica*, and the nocardin strains. **International Journal Systematic Bacteriology**, Ames, v. 24, n. 1, p. 54–63, 1974.

GUAN, T.W.; WU, N.; XIA, Z.F.; RUAN, J.S.; ZHANG, X.P.; HUANG, Y.; ZHANG, L.L. *Saccharopolyspora lacisalsi* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from a salt lake in Xinjiang, China. **Extremophiles**, Berlin, v. 15, n. 3, p. 373-378, 2011.

HAO, W.U.; BIN, L.I.U.; SHANGLI, P.A.N. *Saccharopolyspora subtropica* sp. nov., a thermophilic actinomycete isolated from soil of sugarcane field in Guangxi, China. **International journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 66, n. p. 1990-1995, 2016

HASEGAWA, T.; TAKIZAWA, M.; TANIDA, S. A rapid analysis for chemical grouping of aerobic actinomycetes. **The Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v. 29, n. 4, p. 319-322, 1983.

HUSS, V.A.R.; FESTL, H.; SCHLEIFER, K.H. Studies on the spectrophotometric determination of DNA hybridization from renaturation rates. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 4, n. 2, p. 184-192, 1983.

KARUPPIAH, V.; LI, Y.; SUN, W.; FENG, G.; LI, Z. Functional gene-based discovery of phenazines from the actinobacteria associated with marine sponges in the South China Sea. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Washington, v. 99, n. 14, p. 5939-5950, 2015.

KIM, D.; CHUN, J.; SAHIN, N.; HAH, Y.C.; GOODFELLOW, M. Analysis of thermophilic clades within the genus *Streptomyces* by 16S rRNA ribosomal DNA sequence comparisons. **International Journal Systematic Bacteriology**, Ames, v. 46, n. 2, p. 581-587, 1996.

KIM, O.S.; CHO, Y.J.; LEE, K.; YOON, S.H.; KIM, M.; NA, H.; PARK, S.C.; JEON, Y.S.; LEE, J.H.; YI, H.; WON, S.; CHUN, J. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 62, n. 3, p. 716-721, 2012.

KIM, S.B.; GOODFELLOW, M. *Saccharopolyspora*. In: WHITMAN W.B. **Bergey's manual of Systematics of Archaea and bacteria**. New York: Springer, 2015. p. 1–30.

KIRST, H.A. The spinosyn family of insecticides: realizing the potential of natural products research. **The Journal of Antibiotics**, London, v. 63, n. 3, p. 101-111, 2010.

KORN-WENDISCH, F.; KEMPF, A.; GRUND, E.; KROPPESTEDT, T.; KUTZNER, H.J. Transfer of *Faenia rectivirgula* Kurup and Agre 1983 to the genus *Saccharopolyspora* Lacey and Good- fellow 1975, elevation of *Saccharopolyspora hirsuta subsp. taberi* Labeda 1987 to species level, and emended description of the genus *Saccharopolyspora*. **International Journal Systematic Bacteriology**, Ames, v. 39, n. 4, p. 430-441, 1989.

KROPPESTEDT, R.M. Separation of bacterial menaquinones by HPLC using reverse phase (RP 18) and a silver loaded ion exchanger as stationary phases. **Journal of Liquid Chromatography**, New York, v. 5, n. 12, p. 2359-2367, 1982.

KURUP, P.V.; SCHMITT, J.A. Numerical taxonomy of Nocardia. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 19, n. 8, p. 1035-1048, 1973.

LACEY, J.; GOODFELLOW, M. A novel actinomycete from sugarcane bagasse: *Saccharopolyspora hirsuta* gen. et sp. nov. **Journal of General Microbiology**, London v. 88, n. 1, p. 75-85, 1975.

LECHEVALIER, M.P.; LECHEVALIER, H.A. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. **International Journal Systematic Bacteriology**, Ames, v. 20, n. 4, p. 435-443, 1970.

LI, J.; ZHAO, G.Z.; QIN, S.; HUANG, H.Y.; ZHU, W.Y.; XU, L.H.; LI, W.J. *Saccharopolyspora tripterygii* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the stem of *Tripterygium hypoglaucum*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 59, n. 12, p. 3040-3044, 2009.

LIU, R.; CUI, C.B.; DUAN, L.; GU, Q.Q.; ZHU, W.M. Potent in vitro anticancer activity of metacycloprodigiosin and undecylprodigiosin from a sponge-derived actinomycete *Saccharopolyspora* sp. nov. **Archives of Pharmacal Research**, Seoul, v. 28, n. 12, p. 1341-1344, 2005.

LU, Z.; LIU, Z.; WANG, L.; ZHANG, Y.; QI, W.; GOODFELLOW, M. *Saccharopolyspora flava* sp. nov. and *Saccharopolyspora thermophila* sp. nov., novel actinomycetes from soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 51, n. 2, p. 319-325, 2001.

LV, L-L.; ZHANG, Y-F.; XIA, Z.-F.; ZHANG, J-J.; ZHANG, L-L. *Saccharopolyspora halotolerans* sp. nov., a halophilic actinomycete isolated from a hypersaline lake. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 64, n. 10, p. 3532-3537, 2014.

MEKLAT, A.; BOURAS, N.; ZITOUNI, A.; SABAOU, N.; MATHIEU, F.; SCHUMANN, P.; SPRÖER, C.; KLENK, H-P. *Saccharopolyspora ghardaiensis* sp. nov., an extremely halophilic actinomycete isolated from Algerian Saharan soil. **The Journal of Antibiotics**, London, v. 67, n. 4, p. 299-303, 2014.

MENEZES, C.B.; BONUGLI-SANTOS, R.C.; MIQUELETTTO, P.B.; PASSARINI, M.R.; SILVA, C.H.; JUSTO, M.R.; LEAL, R.R.; FANTINATTI-GARBOGGINE, F.; OLIVEIRA, V.M.; BERLINCK, G.S.; SETTE, L.D. Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of São Paulo state, Brazil.

Microbiological Research, Jena, v. 165, n. 6, p. 466-482, 2010.

MERTZ, F.P.; YAO, R.C. *Saccharopolyspora spinosa* sp. nov. isolated from soil collected in a sugar mill rum still. **International Journal Systematic Bacteriology**, Ames, v. 40, n. 1, p. 34-39, 1990.

MINCER, T.J.; FENICAL, W.; JENSEN, P.R. Culture-dependent and culture-independent diversity within the obligate marine actinomycete genus *Salinispora*.

Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 71, n. 11, p. 7019-7028, 2005.

MINNIKIN, D.E.; O'DONNELL, A.G.; GOODFELLOW, M.; ALDERSON, G.; ATHALYE, M.; SCHAAL, A.; PARLETT, J.H. An integrated procedure for the extraction of bacterial isoprenoid quinones and polar lipids. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 2, n. 5, p. 233-241, 1984.

O'DONNELL, A.G.; FALCONER, C.; GOODFELLOW, M.; WARD, A.C.; WILLIAMS, E. Biosystematics and diversity amongst novel carboxydrotrophic actinomycetes.

Antonie van Leeuwenhoek, Wageningen, v. 64, n. 3/4, p. 325-340, 1993.

PÉREZ, M.; SCHLEISSNER, C.; RODRÍGUEZ, P.; ZUNIGA, P.; BENEDIT, G.; SÁNCHEZ-SANCHO, F.; DE LA CALLE, F. PM070747, a new cytotoxic angucyclinone from the marine-derived *Saccharopolyspora taberi* PEM-06-F23-019B.

The Journal of Antibiotics, London, v. 62, n. 3, p. 167, 2009.

PIMENTEL-ELARDO, S.M.; TIRO, L.P.; GROZDANOV, L.; HENTSCHEL, U. *Saccharopolyspora cebuensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a Philippine sponge (Porifera).

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, London, v. 58, n. 3, p. 628-632, 2008.

PIMENTEL-ELARDO, S.M.; GULDER, T.A.; HENTSCHEL, U.; BRINGMANN, G. Cebulactams A1 and A2, new macrolactams isolated from *Saccharopolyspora cebuensis*, the first obligate marine strain of the genus *Saccharopolyspora*.

Tetrahedron Letters, Oxford, v. 49, n. 48, p. 6889-6892, 2008b.

QIN, S.; CHEN, H.H.; KLENK, H.P.; KIM, C.J.; XU, L.H.; LI, W.J. *Saccharopolyspora gloriosae* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the stem of *Gloriosa superba* L.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, London, v. 60, n. 5, p. 1147-1151, 2010.

QIN, S.; LI, J.; ZHAO, G.Z.; CHEN, H.H.; XU, L.H.; LI, W.J. *Saccharopolyspora endophytica* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the root of *Maytenus austroyunnanensis*. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 31, n. 5, p. 352-357, 2008.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic tree. **Molecular biology and evolution**, New York, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.

SASSER, M. **Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids, MIDI technical note 101**. Newark: MIDI, 1990. 101 p.

SHIRLING, E.B.; GOTTLIEB, D. Methods for characterization of Streptomyces species. **International Journal Systematic Bacteriology**, Ames, v. 16, n. 3, p. 313-340, 1966.

SINMA, K.; ISHIDA, Y.; TAMURA, T.; KITPREECHAVANICH, V.; TOKUYAMA, S. *Saccharopolyspora pathumthaniensis* sp. nov., a novel actinomycetes isolated from termite guts (*Speculitermes* sp.). **The Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v. 57, n. 2, p. 93-100, 2011.

STANEK, J.L.; ROBERTS, G.D. Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography. **Applied Microbiology**, Washington, v. 28, n. 2, p. 226-231, 1974.

SUN, W.; ZHANG, F.; HE, L.; KARTHIK, L.; LI, Z. Actinomycetes from the South China Sea sponges: isolation, diversity, and potential for aromatic polyketides discovery. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 6, n. 1048, p. 1-15, 2015.

TABARES, P.; PIMENTEL-ELARDO, S.; SCHIRMEISTER, T.; HUENIG, T.; HENTSCHEL, U. Anti-protease and immunomodulatory activities of bacteria associated with Caribbean sponges. **Marine Biotechnology**, New York, v. 13, n. 5, p. 883-892, 2011.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, New York, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

TANG, S.K.; WANG, Y.; CAI, M.; ZHI, X.Y.; LOU, K.; XU, L.H.; JIANG, C.L.; LI, W.J. *Saccharopolyspora halophila* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from a saline lake in China. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 59, n. 3, p. 555-558, 2009a.

TANG, S.K.; WANG, Y.; WU, J.Y.; CAO, L.L.; LOU, K.; XU, L.H.; JIANG, C.L.; LI, W.J. *Saccharopolyspora qijiaojiangensis* sp. nov., a halophilic actinomycete isolated from a salt lake. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 59, n. 9, p. 2166-2170, 2009b.

TINDALL, B.J.; ROSSELLÓ-MÓRA, R.; BUSSE, H-J.; LUDWIG, W.; KÄMPFER, P. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 60, n. 1, p. 249-266, 2010.

VADDAVALLI, R.; PEDDI, S.; KOTHAGAUNI, S.Y.; BEGUM, Z.; GADDAM, B.; PERIKETI, M.; LINGA, V.R. *Saccharopolyspora indica* sp. nov., an actinomycete isolated from the rhizosphere of *Callistemon citrinus* (Curtis). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 64, n. 5, p. 1559-1565, 2014.

WILLIAMS, S.T.; GOODFELLOW, M.; ALDERSON, G. Genus *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943, 339AL. In: WILLIAMS, S.T.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1989. v. 4, p. 2452-2492.

YUAN, L.J.; ZHANG, Y.Q.; GUAN, Y.; WEI, Y.Z.; LI, Q.P.; YU, L.Y.; LI, W.J.; ZHANG, Y.Q. *Saccharopolyspora antimicrobica* sp. nov., an actinomycete from soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 58, n. 5, p. 1180-1185, 2008.

ZHANG, J.; WU, D.; LIU, Z. *Saccharopolyspora jiangxiensis* sp. nov., isolated from grass-field soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 59, n. 5, p. 1076-1081, 2009.

ZHANG, J.; WU, D.; ZHANG, J.; LIU, Z.; SONG F. *Saccharopolyspora shandongensis* sp. nov., isolated from wheat-field soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 58, n. 5, p. 1094-1099, 2008.

ZHANG, Y.J.; ZHANG, W.D.; QIN, S.; BIAN, G.K.; XING, K.; LI, Y.F.; CAO, C.L.; JIANG, J. H. *Saccharopolyspora dendranthema* sp. nov. a halotolerant endophytic actinomycete isolated from a coastal salt marsh plant in Jiangsu, China. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen v. 103, n. 6, p. 1369-1376, 2013.

ZHOU, Z.H.; LIU, Z.H.; QIAN, Y.D.; KIM S.B.; GOODFELLOW, M. *Saccharopolyspora spinosporotrichia* sp. nov., a novel actinomycete from soil. **International Journal Systematic Bacteriology**, Ames, v. 48, n. 1, p. 53-58, 1998.

7 BACTÉRIAS ASSOCIADAS COM ESPONJAS MARINHAS PRODUZEM DIPEPTÍDEOS COM ATIVIDADE ANTI OOMICETO

A grandeza não vem quando as coisas sempre vão bem para você, mas a grandeza vem quando você é realmente testado, quando você sofre alguns golpes, algumas decepções, quando a tristeza chega. Porque apenas se você esteve nos mais profundos vales você poderá um dia saber o quão magnífico é se estar no topo da mais alta montanha.

- Richard Milhous Nixon

Resumo

O objetivo deste trabalho foi investigar os compostos produzidos por bactérias isoladas de esponjas marinhas, capazes de inibir o crescimento de oomicetos fitopatogênicos pertencentes ao gênero *Pythium*. Os bioensaios mostraram que 25% das bactérias associadas às esponjas *Didiscus oxeata* e *Scopalina ruetzleri* inibiram o crescimento micelial de *P. aphanidermatum*, *P. graminicola* e *P. ultimum*. A motilidade de zoósporo de *P. aphanidermatum* foi totalmente cessada dentro de 20 min de exposição a extratos orgânicos das bactérias testadas. Subsequentemente, foi realizado o fracionamento do extrato bruto guiado por bioensaio usando cromatografia líquida de alta eficiência. A identificação estrutural dos compostos, presente na fração bioativa, foi realizada por espectrometria de massas sequencial com fonte de ionização por eletrospray. Esta ferramenta possibilitou a identificação de uma mistura de dipeptídeos cíclicos pertencentes à classe das dicetopiperazinas, a partir de duas bactérias filogeneticamente distintas, previamente classificadas com base no sequenciamento parcial do gene 16S rRNA como *Terrabacter* sp. ASPSP 140 e *Bacillus* sp. ASPSP 434. Estes dados reforçam o potencial uso de bactérias associadas às esponjas marinhas para o controle de oomicetos fitopatogênicos e fornecem a base para o futuro desenvolvimento de novos fungicidas de baixo impacto ambiental.

Palavras-chave: *Pythium* spp; Dicetopiperazinas; *Bacillus*; *Terrabacter*; ESI-EM/EM; Ciclo (Ieu-Fen); *Scopalina ruetzleri*; *Didiscus oxeata*

Abstract

In this study, we investigated the compounds produced by bacteria isolated from marine sponges capable of inhibiting the growth of plant-pathogenic oomycetes belonging to the genus *Pythium*. The bioassay showed that bacteria associated with the sponges *Didiscus oxeata* and *Scopalina ruetzleri* inhibit the growth of *P. aphanidermatum*, *P. ultimum* and *P. graminicola*. The zoospore motility of *P. aphanidermatum* has been completely ceased within 20 min of exposure to organic extracts of the bacteria tested. Subsequently, bioassay-guided fractionation was performed on the crude extracts by using high-performance liquid chromatography. The structural identification of compounds present in the bioactive fraction was performed by tandem mass spectrometry with electrospray ionization source. This tool enabled the identification of cyclic dipeptides belonging to class of diketopiperazines, from two phylogenetically distinct bacteria, previously classified

based on partial 16S rRNA gene sequencing as *Terrabacter* sp. ASPSP 140 and *Bacillus* sp. ASPSP 434. These data support the potential of bacteria associated with marine sponges for the control of plant-pathogenic oomycetes and it provide the basis for the future development of new fungicides with reduced environmental impact.

Keywords: *Pythium* spp; Diketopiperazinas; *Bacillus*; *Terrabacter*; ESI-MS/MS; Cyclic dipeptides; *Scopalina ruetzleri*; *Didiscus oxeata*

7.1 Introdução

A necessidade de maximizar a produtividade de alimentos para consumo humano ou animal tem aumentado drasticamente o uso de defensivos agrícola (ALVES FILHO, 2002). De acordo com dados do último relatório da Associação Brasileira de Saúde Coletiva (CARNEIRO et al., 2015), o uso de pesticidas no Brasil aumentou mais de 160% entre o período de 2000 a 2012. Ademais, a crescente preocupação do impacto de resíduos de pesticidas sintéticos à saúde (QUEIROZ et al., 2008, 2012; CERDEIRA et al., 2015) tem atraído o interesse de cientistas para buscar novas alternativas eficazes e ecologicamente sustentáveis para o controle de doenças de plantas ou ervas daninhas (CREVELIN et al., 2013; SILVA et al., 2014; KANCHISWAMY et al., 2015; MELO et al., 2016).

Microrganismos associados com esponjas têm sido uma fonte promissora de diferentes tipos de compostos biotecnológicos, totalizando cerca de 5.300 diferentes produtos descritos (LAPORT et al., 2009). Tais compostos são explorados principalmente pela indústria farmacêutica com as seguintes aplicações: antitumoral, antimicrobiano, antiviral, antiprotozoário, anti-inflamatório e neurosupressivo (TAYLOR et al., 2007; LAPORT et al., 2009; DOBSON et al., 2015). No entanto, pouco esforço tem sido dedicado à descoberta de compostos agroquímicos a partir de produtos naturais marinhos (DHANASEKARAN et al., 2012; DOBSON et al., 2015; SILVA, 2015).

As esponjas e/ou suas bactérias associadas podem ser uma fonte alternativa para o desenvolvimento de agroquímicos, desde que as assembleias bacterianas que habitam estes animais têm sido avaliadas para inibir microrganismos de origem clínica (HENTSCHEL et al., 2001; THOMAS et al., 2010; DEVI et al., 2010) e, mais recentemente, apresentam potencial para controlar o crescimento micelial de importantes fungos fitopatogênicos (EL AMRAOUI et al., 2014; KELLER-COSTA et al., 2014; SILVA, 2015).

Dentre os patógenos que causam grandes perdas econômicas para agricultura, se destacam os oomicetos, os quais são muito bem adaptados a vida aquática e, portanto, oferecem um alto risco para agricultura em ambientes protegidos, tais como os sistemas hidropônicos (CORRÊA; BETTIOL, 2009). Uma vez presente na solução nutritiva para cultivo hidropônico, estes fitopatógenos se espalham rapidamente e infectam raízes através de seus zoósporos causando o sintoma de podridão das raízes e, consequente, tombamento da planta (CORRÊA; BETTIOL, 2009). Além do mais, ainda não existem compostos químicos registrados para controle de *Pythium* spp. em culturas hidropônicas no Brasil.

Suportado pelo evidente sucesso das interações bactérias-esponja como a maior fonte de novas drogas, este trabalho também explora o consórcio bacteriano presente em esponjas para suprir crescentes necessidades da agrobiotecnologia. Dessa forma, linhagens bacterianas associadas às esponjas *S. ruetzleri* e *D. oxeata* foram isoladas e empregadas como recursos biológicos para a descoberta de compostos ativos frente a *Pythium* spp. Consequentemente, aqui é apresentado o efeito anti oomiceto de extratos brutos destas bactérias, bem como a investigação dos compostos bioativos utilizando ensaios bioguiados e ferramentas analíticas, como a espectrometria de massas.

7.2 Material e Métodos

7.2.1 Screening de bactérias associadas à esponjas com potencial antagonístico frente a *Pythium* spp.

Ensaio *in vitro* para antagonismos direto em placas de Petri foram realizadas com as 56 bactérias previamente isoladas das esponjas *S. ruetzleri* e *D. oxeata*. As linhagens fitopatogênicas teste utilizados neste ensaio foram: *P. aphanidermatum* (CMAA 243), *P. ultimum* (CCIBT 2024) e *P. graminicola* (CCIBT 3828), obtidas na coleção de cultura do Laboratório de Microbiologia Ambiental, EMBRAPA Meio Ambiente, Jaguariúna, São Paulo, Brasil. Estes microrganismos foram crescidos em meio de cultura batata dextrose ágar (BDA), a 28 °C, por 24-72 h.

Para o teste de antagonismo direto, os isolados bacterianos foram estriados em meio de cultivo GY (10 g L⁻¹ Glicose, 10 g L⁻¹ extrato de levedura e ágar 15 g L⁻¹) e crescidos a 28°C por 3 dias. Após total crescimento bacteriano foi adicionado ao centro da placa um disco de ágar com as respectivas espécies de *Pythium*

previamente cultivadas, como ilustrado no esquema apresentado na Figura 23. Os resultados foram observados após 24-72 horas de incubação, considerando o antagonismo positivo para os isolados que inibiram/ou pararam o crescimento do micélio fúngico.

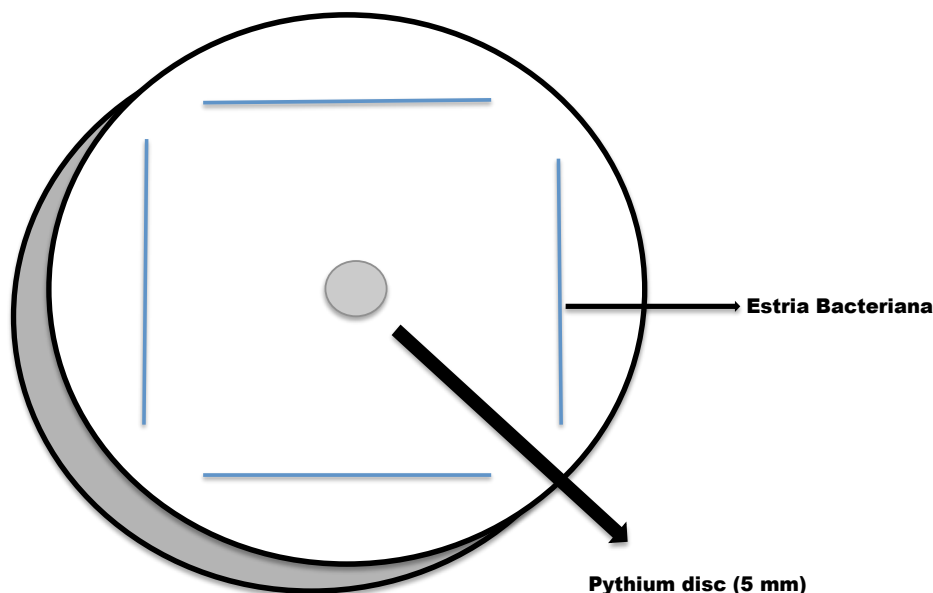


Figura 23 - Esquema ilustrativo do teste de antagonismo direto em placa de Petri. As linhagens fúngicas foram acrescida no centro da placa e os isolados bacteriano estriado 3 dias antes

7.2.2 Obtenção dos metabólitos secundários de bactérias

Os extratos orgânicos foram obtidos por processos fermentativos dos isolados bacterianos em 500 mL de meio GY peptona (10 g L^{-1} Glicose, 10 g L^{-1} extrato de levedura, 10 g L^{-1} Peptona) feito com água do mar artificial (33 g L^{-1} Red Sea Salt®, Red Sea, Houston, TX, USA) e incubados sob agitação constante (150 rpm), a 28°C por 8 dias. A fim de obter os metabólitos extracelulares presente no caldo de cultivo, as células bacterianas em suspensão foram retiradas por centrifugação a 9.000 rpm, por 12 minutos. Os metabólitos secundários foram extraídos segundo Canova et al. (2010), a partir do caldo de cultivo livre de células (pH 3,0), utilizando diclorometano (DCM) como solvente extrator. A fase orgânica foi reduzida em evaporador rotativo (R-250/B490, Buchi/Schweiz), a 120 rpm, em 40°C . Os extratos brutos obtidos foram pesados e armazenados em freezer a -20°C . O controle negativo foi obtido

através da extração do caldo de cultura sem inóculo, conforme procedimentos supracitados.

7.2.3 Avaliação da atividade anti-oomicota dos metabólitos secundários

O bioensaio para monitoramento da atividade anti-oomiceto foi realizado com o fitopatógeno *P. aphanidermatum*. A bioatividade foi avaliada usando a técnica de difusão em ágar (BAUER et al., 1960), utilizando discos de papel autoclavados e impregnados com 10 μL (5 mg mL^{-1}) da suspensão dos extratos brutos, solubilizados em dimetilsulfóxido 1% (DMSO), contra disco de 5 mm do fitopatógeno em meio BDA, a 28 °C, por 24 h. Após este período, os extratos ativos foram identificados devido a formação de halos de inibição.

7.2.4 Inibição da motilidade de zoósporos

O efeito inibitório apresentado pelos extratos brutos avaliados na etapa anterior foi explorado sobre a motilidade de zoósporos do mesmo patógeno em microplacas de 96 poços. Os poços foram preenchidos com 100 μL de uma suspensão de zoósporos, obtidas através da técnica de Rahimian e Banihashemi (1979), adaptado por Côrrea, Bettiol e Sutton (2010), utilizando o meio de cultura V8 (10 % de suco V8, 2 g L^{-1} CaCO_3 e 16 g L^{-1} de ágar). Em seguida, 20 ou 50 μL de extratos orgânicos na concentração de 5 mg mL^{-1} em DMSO 1 % foram adicionados em triplicata aos poços. O controle negativo foi realizado utilizando o extrato proveniente do caldo de cultura sem inóculo e o solvente DMSO. Extratos possivelmente inativados por aquecimento durante 5 min a 60 °C foram também incluídos na avaliação. Alterações na motilidade dos esporos foram observadas usando um microscópio binocular com uma ampliação de 400 vezes. Em até 24 horas foram avaliados os efeitos sobre os zoósporos.

7.2.5 Avaliação da atividade citotóxica

O bioensaio de letalidade à *Artemia salina* foi realizado para checar a atividade citotóxica dos extratos ativos. Ovos de *A. salina* foram eclodidos em água do mar artificial (33 g L^{-1} Red Sea Salt®, Red Sea, Houston, TX, USA), por 36 h, sob oxigenação constante. O ensaio foi realizado em placas de 24 poços, as quais foram

preenchidas com um volume de 1,35 mL do caldo de cultivo contendo 10 neonatos de *A. salina*. A diluição dos extratos brutos foram alcançadas após solubilização em DMSO 1 % para a concentração inicial de 10 mg mL^{-1} e, então, diluição seriada foi realizada para obter concentrações de 0,1; 1; 10; 100 e $1.000 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. Para cada concentração, quatro réplicas foram realizadas. Após 24 h, sob uma lupa binocular, foram observados o número de neonatos de *A. salina* mortos, por cada poço. Controle negativo foi realizado utilizando apenas DMSO 1% e a porcentagem de mortalidade foi então determinada e calculada a LC_{50} .

7.2.6 Fermentação em escala ampliada, obtenção do extrato bruto e cromatografia em coluna clássica

Após verificar a atividade anti-oomiceto e citotóxica dos extratos brutos, uma nova fermentação foi realizada em escala ampliada (25 litros). As condições de cultivo e os procedimentos para obtenção do extrato bruto seguiram as descrições apresentada no item 7.2.2.

A partição líquido/líquido foi iniciada pela solubilização do extrato bruto em solução Metanol/Água ($\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$) 90:10 (v/v) e extração com Hexano (150 mL; 3 vezes). Em seguida foram adicionados 57 mL de H_2O para tornar a relação $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, 70:30 (v/v). À esta solução foi adicionado Clorofórmio (150 mL; 3 vezes), a fim de obter a segunda fração (CHCl_3). O MeOH foi removido por rotaevaporação, e, posteriormente, 100 mL de Acetato de Etila (AcOEt) foram adicionados para obtenção da fração acética. O extrato aquoso restante foi submetido ao processo de liofilização. As frações em MeOH, CHCl_3 , AcOEt e aquosa obtidas por partição líquido-líquido foram pesadas e, em seguida, dissolvidas em DMSO 1% para obtenção da concentração final de 5 mg mL^{-1} . As mesmas foram submetidas aos bioensaios frente a *Pythium* spp.

As substâncias presentes nas frações com atividade pronunciada, bioensaiadas frente a *Pythium* spp. foram submetidas ao processo de separação cromatográfica utilizando a cromatografia em coluna clássica (CCC), com Sephadex LH-20 como fase estacionária. O método foi realizado com o intuito de obter uma pré-purificação das substâncias presentes nessas frações. Em seguida, as frações foram analisadas e reunidas por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) usando como fase móvel uma mistura de solventes de polaridade crescente

(Hex – AcOEt – MeOH). Como fase estacionária foi utilizada placas pré-fabricadas de sílica gel 60 (Merck, Whitehouse Station, NJ), as quais foram visualizadas sob a pulverização de revelador cromogênico (vanilina sulfúrica e H₂SO₄ em etanol) e luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 364 nm. Posteriormente, as frações reunidas com base em seus perfis cromatográficos foram submetidas ao bioensaio frente a *P. aphanidermatum*.

7.2.7 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) analítica e preparativa das frações bioativas

Após a pré-purificação por CCC, as frações bioativas foram primeiramente analisadas por CLAE-UV em modo analítico e, em seguida, submetidas ao processo de purificação em escala preparativa usando um equipamento Shimadzu, equipado com uma controladora CBM-20a, 2 bombas LC-6AD, injetor de amostra manual Rheodyne, detector UV-vis SPD-20A, degaseificador DGU-20A5 e coletor automático de frações. A separação dos compostos foi realizada em uma coluna cromatográfica C₁₈ Shim-Pack Shimadzu (250 x 20 mm, 5 µm). A fase móvel consistiu de H₂O (solvente A) e MeOH + 0,1% de ácido fórmico (solvente B). Os parâmetros de eluição seguiram: 40 minutos de gradiente 20-80% MeOH/H₂O, 10 minutos de 100% MeOH, em fluxo contínuo de 18 mL min⁻¹. O monitoramento dos compostos foi realizado nos λ 270 e 340 nm. As frações resultantes foram agrupadas com base nos perfis cromatográficos através de análise por CCDC e, posteriormente, estas novas frações foram testadas frente a *P. aphanidermatum*.

7.2.8 Análise das frações bioativas por espectrometria de massas (EM)

A análise por EM foi realizada usando um sistema ACQUITY UPLC H-Class acoplado aos detectores de arranjo de diodos (do inglês, Diode Array Detector – DAD) e ao espectrômetro de massas quadrupolar sequencial Xevo® TQ-S (Waters Corporation, Milford, MA, USA), o qual foi equipado com um fonte de ionização Z-spray operando em modo positivo de análise. A análise por EM foi realizada via inserção direta dos extratos brutos e das subfrações ativas Fr 35 e Fr 36. Para isso, as amostras foram preparadas em MeOH e, em seguida, um volume de 3 µL de cada amostra foi injetada dentro da fonte de ionização por eletrospray (do inglês, electrospray ionization – ESI), em modo de análise *Full Scan* (ESI-EM).

As análises das sub-frações ativas Fr 35, Fr 36 e da sub-fração inativa Fr 37, bem como da subfração ativa reunida Fr 35-36 foram também realizadas por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada ao espectrômetro de massas (CLUE-EM). Um volume de 5 μL de amostra foi injetada em uma coluna Ascentis® Express C_{18} (100 x 4,6 mm, 2,7 μm o diâmetro da partícula) da Supelco. A fase móvel consistiu de uma solução aquosa contendo 0,1% de Ácido Fórmico (solvente A) e MeOH + 0,1% de Ácido Fórmico (solvente B). A separação dos compostos foi realizada em modo gradiente de 20 a 80% de MeOH a uma taxa de fluxo de 400 $\mu\text{L min}^{-1}$. Os parâmetros de operação utilizados na fonte de ionização Z-spray foram: voltagem do capilar = 3.2 kV, voltagem do cone = 40 V, *source offset* = 60 V, temperatura da fonte Z-spray = 150 °C, temperatura de dessolvatação do gás N_2 = 300 °C, fluxo do gás de dessolvatação = 600 L h^{-1} . A faixa de massas usada no modo de análise *Full-Scan* foi de 150 a 1.200 unidades de massa (u). Os experimentos de espectrometria de massas sequencial (CLUE-EM/EM) foram realizados por dissociação induzida por colisão (DIC) usando argônio como gás de colisão para os íons precursores de interesse ($[\text{M} + \text{H}]^+$).

7.2.9 Análise da sub-fração ativa reunida Fr 35-36 e da amostra padrão do dipeptídeo por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas

A subfração ativa reunida Fr 35-36 e a substância padrão do dipeptídeo ciclo (Fen-Leu) obtido pela (Sigma Aldrich, USA), onde, Fen = Fenilalanina e Leu = Leucina foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), em aparelho Shimadzu QP2010Plus (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão), equipado com injetor automático AOC-20i, fonte de ionização por elétrons (EI-EM) e analisador quadrupolar. Para a dissolução das amostras foi utilizado uma mistura de AcOEt/MeOH 60% grau espectroscópico (marca Merck).

A separação cromatográfica foi realizada em coluna capilar Rtx5-MS (Restek) de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d. i. x 0,25 μm de filme), composta de 5% de difenilsiloxano e 95% de dimetilpolisiloxano. Foi utilizado gás Hélio (99,999%) como gás de arraste, a um fluxo constante de 1,0 mL min^{-1} . A temperatura do injetor foi de 250 °C e o volume de injeção foi de 1,0 μL . A temperatura do forno foi programada de 100 °C a 280 °C a uma velocidade de 20 °C min^{-1} .

7.3 Resultados

7.3.1 Seleção de bactérias antagônicas

As bactérias previamente isoladas das esponjas *S. ruetzleri* e *D. oxeata* foram exploradas quanto a capacidade de inibir o crescimento *in vitro* de *Pythium* spp. A Figura 24 ilustra os resultados obtidos pelo presente ensaio.

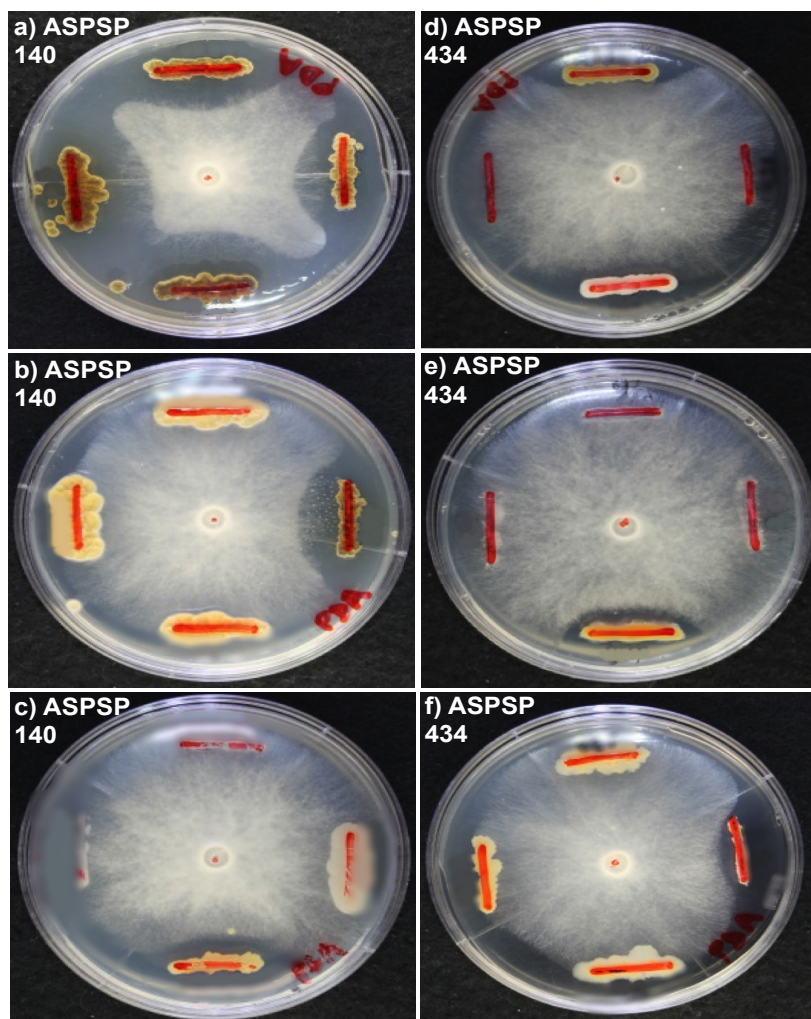


Figura 24 - Bioensaio de antagonismo de bactérias provenientes de esponjas marinhas frente a fitopatógenos do gênero *Pythium*. Na coluna a esquerda é apresentado o antagonismo proveniente do isolado ASPSP 140, enquanto na coluna a direita é apresentado o antagonismo para o isolado ASPSP 434. As linhagens fitopatogênicas testadas estão distribuídos no sentido horizontal como: *P. aphanidermatum*; *P. ultimum* e *P. graminicola*

Os resultados de antagonismos revelaram diferentes graus de inibição micelial entre as espécies de *Pythium* avaliadas, classificadas como: fraca (+), moderada (2+) e forte (3+). Do total de 56 linhagens apenas 25% apresentaram algum tipo de inibição, sendo que apenas os isolados *Terrabacter* sp. (ASPSP 140) e *Bacillus* sp. (ASPSP 434) apresentaram efeito inibitório para todos os fitopatógenos utilizados, como apresentados na Tabela 6.

Table 6 – Avaliação da atividade de inibição do crescimento micelial de oomicetos fitopatogênicos por bactérias isoladas de esponjas marinhas

Código do isolado	Espécie mais próxima*	Inibição do crescimento micelial de fitopatógenos		
		1	2	3
ASPSP 154	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	+	-	+
ASPSP 472	<i>Brevibacillus</i> sp.	-	+	-
ASPSP 30	<i>Kocuria</i> sp.	+	++	-
ASPSP 41	<i>Pseudomonas</i> sp.	+	+	-
ASPSP 140	<i>Terrabacter</i> sp.	+++	++	+
ASPSP 52	<i>Arthrobacter</i> sp.	-	+	-
ASPSP 40	<i>Saccharopolyspora</i> sp.	-	+	-
ASPSP 61	<i>Streptomyces</i> sp.	-	-	+
ASPSP 434	<i>Bacillus</i> sp.	+	+	+
ASPSP 39	<i>Bacillus</i> sp.	+	+	-
ASPSP 469	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	++	-	-
ASPSP 442	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	+	-	+
ASPSP 156	<i>Streptomyces</i> sp.	-	-	+
ASPSP 442	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	++	-	+

Fitopatógenos: 1, linhagem de *P. aphanidermatum*; 2, *P. graminicola*; 3, *P. ultimum*. * Análise BLASTn realizada dentro do servidor EzTaxon

Portanto, os isolados ASPSP 140 e ASPSP 434 foram selecionados para estudos químicos posteriores, bem como para geração de extratos dos metabólitos secundários.

7.3.2 Ensaio de difusão em discos

As cepas selecionadas foram cultivadas em pequena escala para extração de metabólitos, utilizando o solvente diclorometano. Os extratos brutos foram avaliados quanto a inibição de *P. aphanidermatum* para determinação do potencial anti oomiceto *in vitro* de seus metabólitos secundários. O bioensaio é apresentado na Figura 25.

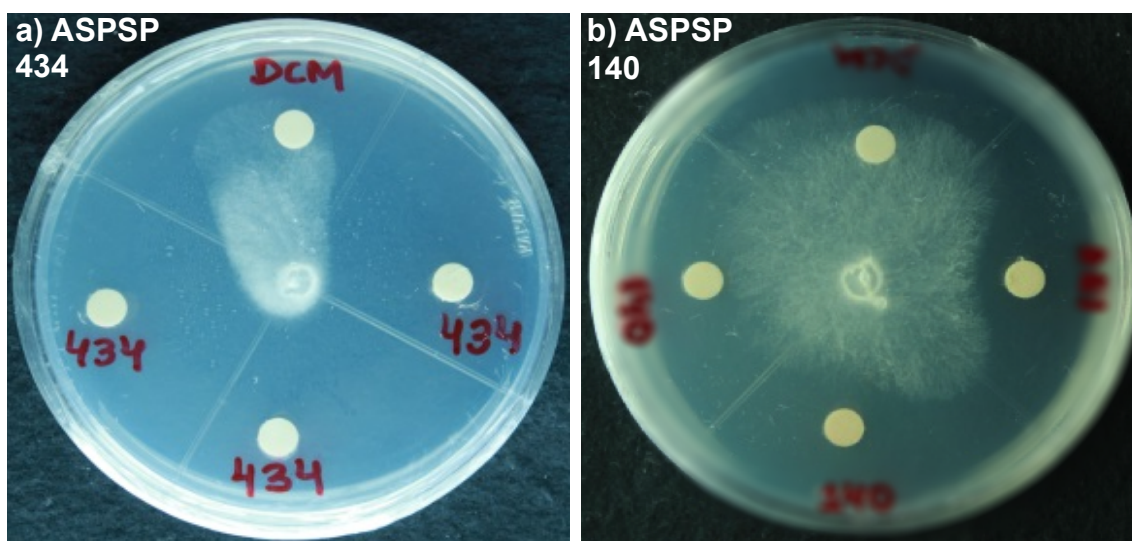


Figura 25 - Inibição do crescimento de *P. aphanidermatum* por metabólitos extraídos das bactérias pré-selecionadas ASPSP 434 e 140, utilizando o método de difusão em discos

7.3.3 Avaliação da motilidade de zoósporos após contato com extratos brutos ativos

A adição de 50 ou 20 μ L de extratos das linhagens ASPSP 140 e ASPSP 434 causaram a imobilização de todos os zoósporos de *P. aphanidermatum* dentro de 20 min (para 50 μ L) ou 30 min (para 20 μ L). O composto ativo a inibição de zoósporos, não foi inativado quando submetido a aquecimento em 60 °C por 5 min. O extrato obtido do cultivo sem inóculo não foi capaz de imobilizar zoósporos, mesmo após 24 h de avaliação.

7.3.4 Avaliação da atividade citotóxica

Os resultados do ensaio de citotoxicidade à *A. salina* são mostrados na Tabela 7. O extrato do isolado ASPSP 140 apresentou LC_{50} de $73 \mu\text{g mL}^{-1}$. Este valor de LC_{50} tem sido reportado pela indústria farmacêutica para ter uma expressiva atividade citotóxica, a qual pode, posteriormente, ser avaliada para atividade farmacológica. Enquanto o isolado ASPSP 434 obteve valor de LC_{50} maior que $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ e, portanto, apresenta baixa atividade citotóxica.

Table 7 - Porcentagem de morte e valores LC_{50} para ensaio de citotoxicidade à *A. salina*, a partir de extratos brutos de bactérias isoladas de esponjas

Extrato $\mu\text{g mL}^{-1}$	Porcentagem de morte em 24 horas						LC_{50} Limit. Confi.
	0	0,1	1	10	100	1000	
ASPSP 140	0	0	2,5	30	80	100	$73 \pm (62;85)$
ASPSP 434	0	10	12,5	20	30	100	$405 \pm (291;648)$

Obs: Valores de LC_{50} maiores que $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ são considerados não citotóxicos

7.3.5 Estudo do perfil químico dos extratos brutos ativos

Inicialmente, os extratos brutos ativos foram analisados por CLUE-DAD, conforme mostrado na Figura 26 a e b.

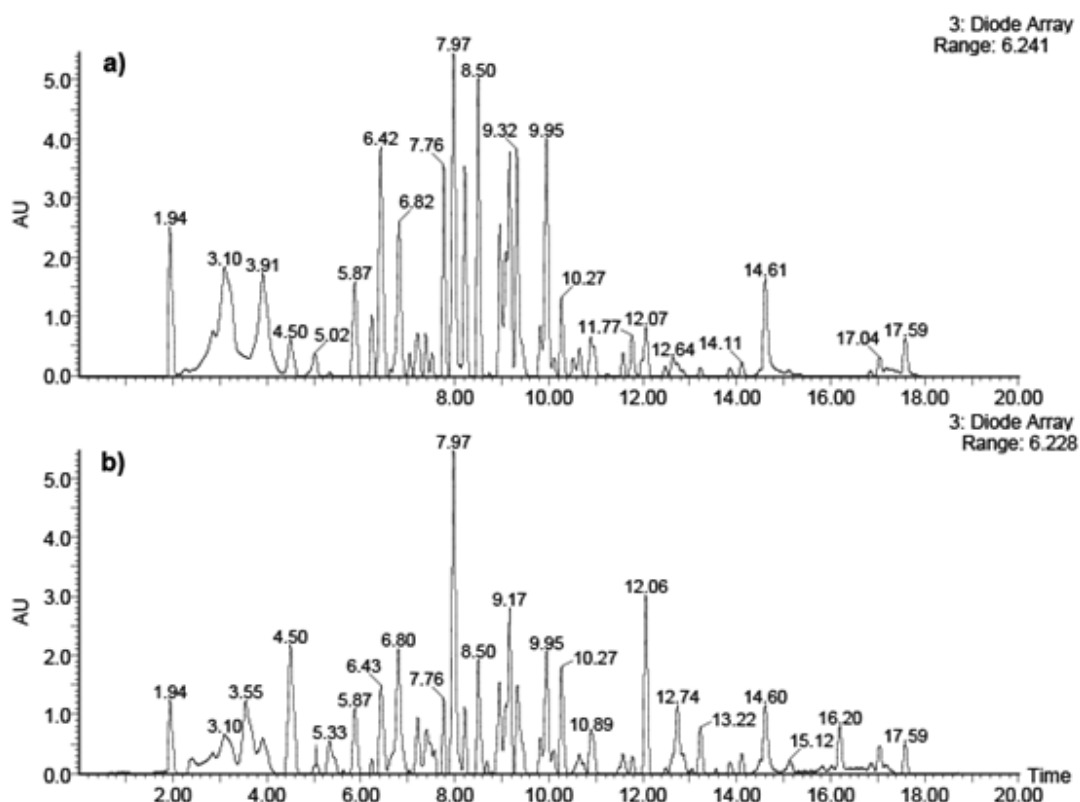


Figura 26 - Perfil químico dos extratos brutos a) ASPSP-140 e b) ASPSP-434 obtidos por CLUE-DAD

O perfil químico por CLUE-DAD dos extratos brutos apresentaram complexidade devido à quantidade de compostos presentes. Os picos cromatográficos foram monitorados por meio dos seus espectros de UV, em seus respectivos tempos de retenção (tR) (dados não mostrados). Os resultados demonstram que alguns picos em ambos cromatogramas possuem alguma semelhança em seus espectros de UV, mas outros picos mostraram espectros de UV distintos em determinados tR. Além do mais, há também compostos que não apresentaram bons grupos cromóforos para absorção na região do ultravioleta. Desta forma, o perfil químico dos extratos brutos também foram analisados por meio dos seus espectros de massas via inserção direta, como mostrado nas Figuras 27 a e b.

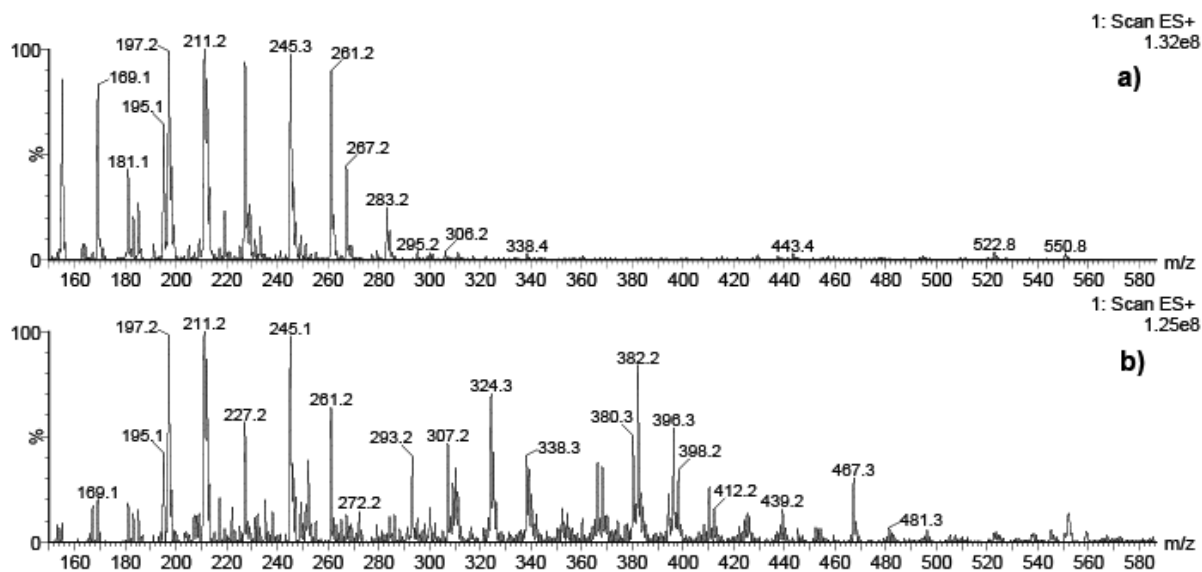


Figura 27 - Espectro de massas dos extratos brutos a) ASPSP-434 e b) ASPSP-140

Com base nos espectros de massas obtidos para cada um dos extratos, nota-se alguma semelhança com relação aos compostos presentes na faixa baixa de massa referente aos picos de m/z 150-300. Por outro lado, o extrato bruto ASPSP-140 apresentou compostos distintos na faixa de massas acima de 300 u em comparação ao extrato bruto ASPSP-434, evidenciando assim a diversidade química de compostos produzidos por bactérias filogeneticamente diferentes. Posteriormente, devido a maior quantidade em massa, bem como a pronunciada bioatividade, os estudos químicos posteriores foram realizados com o extrato bruto ASPSP-434.

A pré-purificação do extrato bruto ASPSP-434 foi realizada utilizando CCC em sephadex LH-20, em que foram coletadas 21 frações. As frações bioativas 9 e 10 foram analisadas por CCDC e reunidas de acordo com a semelhança dos perfis cromatográficos e valores de R_f (fator de retenção dos compostos), bem como por espectrometria de massas via inserção direta, conforme mostrado na Figura 28 a e b.

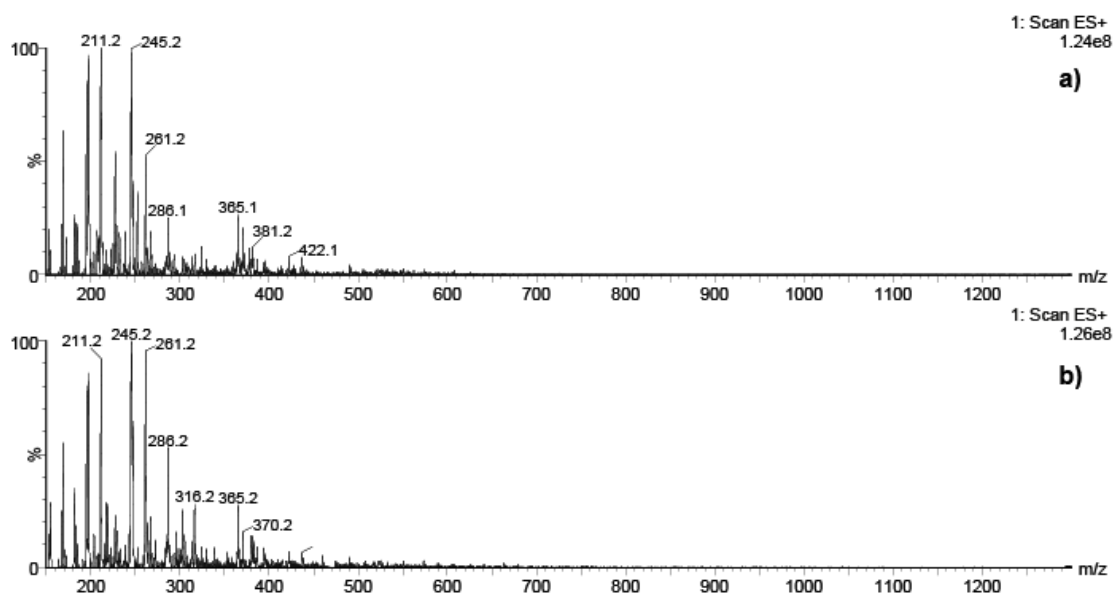


Figura 28 - Espectro de massas dos extratos brutos a) Fr 9 e b) Fr 10 obtidos via inserção direta

A análise por espectrometria de massas corroborou com o perfil químico obtido por CCDC, de forma que as frações Fr 9 e Fr 10 foram agrupadas originando a Fr 9-10. Em seguida, a Fr 9-10 foi submetida ao bioensaio frente *P. aphanidermatum*, onde apresentou pronunciada atividade inibitória ao crescimento micelial (Figura 29).

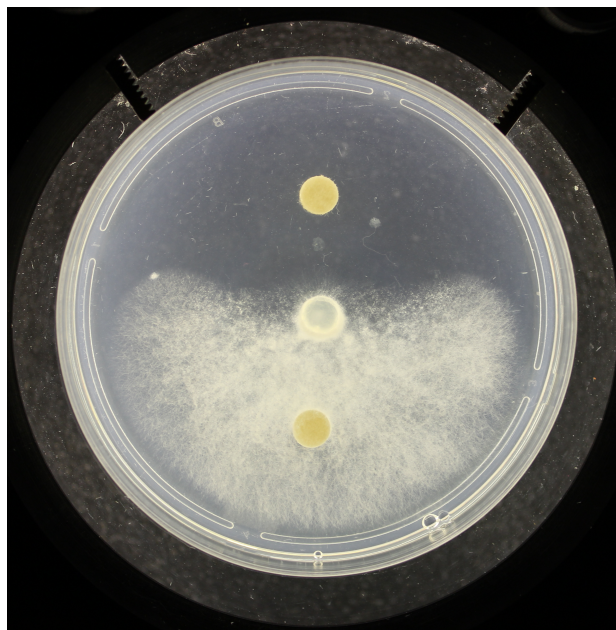


Figura 29 - Bioatividade dos compostos químicos presentes na fração agrupada (Fr 9-10), frente ao oomiceto fitopatogênico *P. aphanidermatum*. Na parte superior é mostrado a inibição utilizando 10 μL do extrato em DMSO 1 % para uma concentração de 10 mg mL^{-1} . Na parte abaixo foi adicionado somente DMSO 1% sem o extrato

Subsequentemente, a fração ativa Fr 9-10 foi analisada por CLAE-UV a fim de obter a separação eficiente dos compostos presentes nesta fração. Em seguida, a fração Fr 9-10 foi re-fracionada por CLAE preparativo obtendo 48 subfrações. As subfrações coletadas foram submetidas ao bioensaio de atividade frente ao *P. aphanidermatum* e, dentre as subfrações bioensaiadas, as subfrações Fr 35 e 36 apresentaram pronunciada atividade (Figura 30).

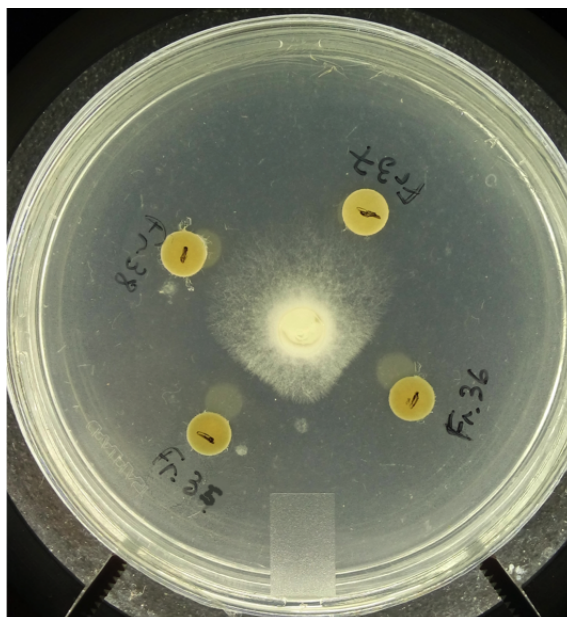


Figura 30 - Bioatividade dos compostos químicos presentes nas frações 35 e 36 frente *P. aphanidermatum*

As subfrações foram analisadas por CCDC e agrupadas de acordo com a similaridade dos perfis cromatográficos e valores de R_f , bem como o perfil químico obtido por espectrometria de massas (Figura 31 a e b).

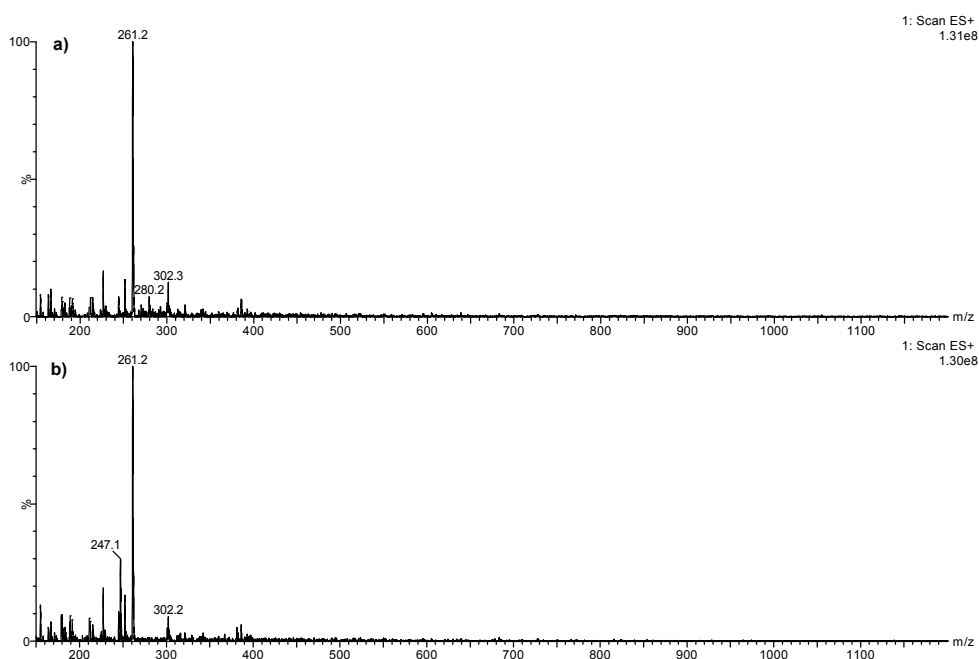


Figura 31 - Espectros de massas das subfrações Fr 35(a) e Fr 36 (b), evidenciando a similaridade dos compostos majoritários, obtidos via inserção direta

A análise do espectro de massas da Figura 31 revelou uma semelhança na constituição química em ambas as subfrações ativas, os quais podem ser evidenciados pela presença dos picos de m/z 261, m/z 247, m/z 245 e m/z 227. Logo, a análise por CLUE-EM foi realizada com as subfrações ativas Fr 35 e Fr 36, bem como com a subfração inativa Fr 37 na tentativa de identificar a massa molecular do composto responsável pela atividade biológica (Figura 32 a-c).

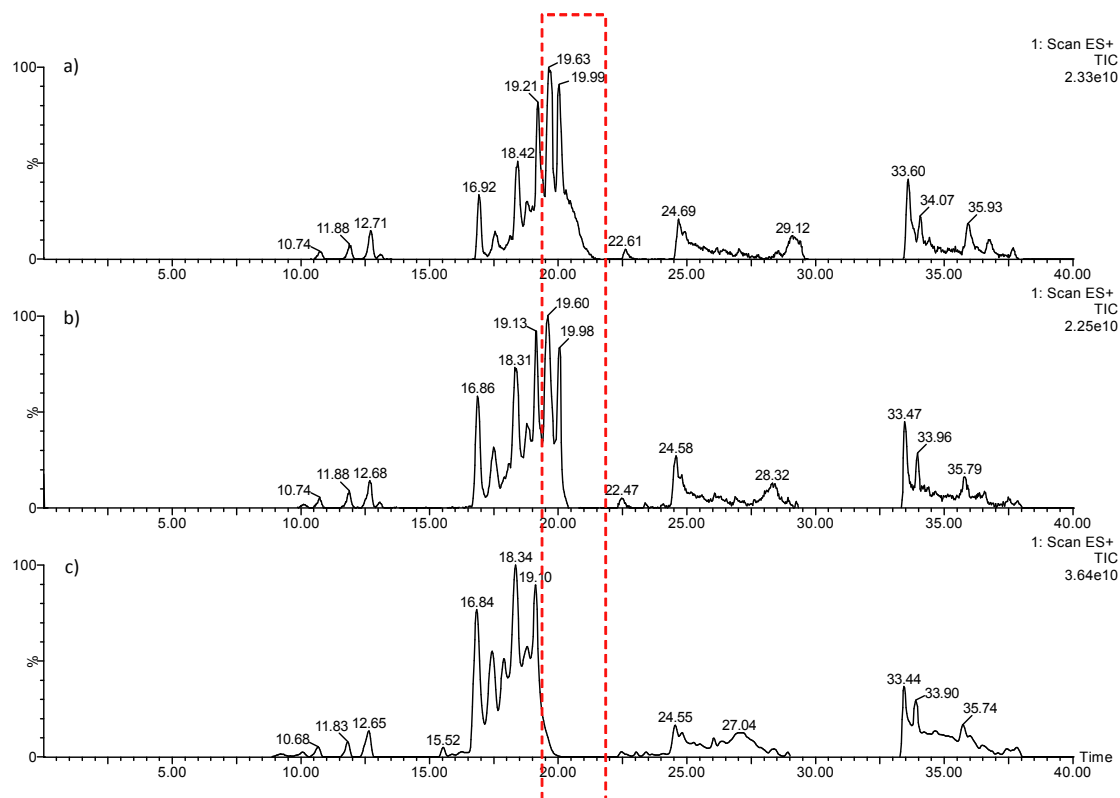


Figura 32 - Perfis cromatográficos obtidos por CLUE-EM das subfrações bioativas Fr 36 e Fr 35 (a e b) e subfração inativa Fr 37 (c)

A Figura 32 mostra o perfil cromatográfico de corrente iônica total (TIC, do inglês, *Total Current Ionic*) das subfrações ativas Fr 35 e Fr 36 em comparação com a subfração inativa Fr 37. Assim, nota-se que a maioria dos picos cromatográficos nas subfrações Fr 35, 36 e 37 são similares quando comparados com os seus respectivos espectros de massas. Por outro lado, foi observado que os picos em t_R = 19,60 min e t_R = 19,99 min apareceram nas subfrações ativas Fr 35 e Fr 36, estando assim, ausentes na subfração inativa Fr 37. Os espectros de massas obtidos nos picos cromatográficos t_R = 19,60 min e t_R = 19,99 min estão mostrados na Figura 33 (a e b).

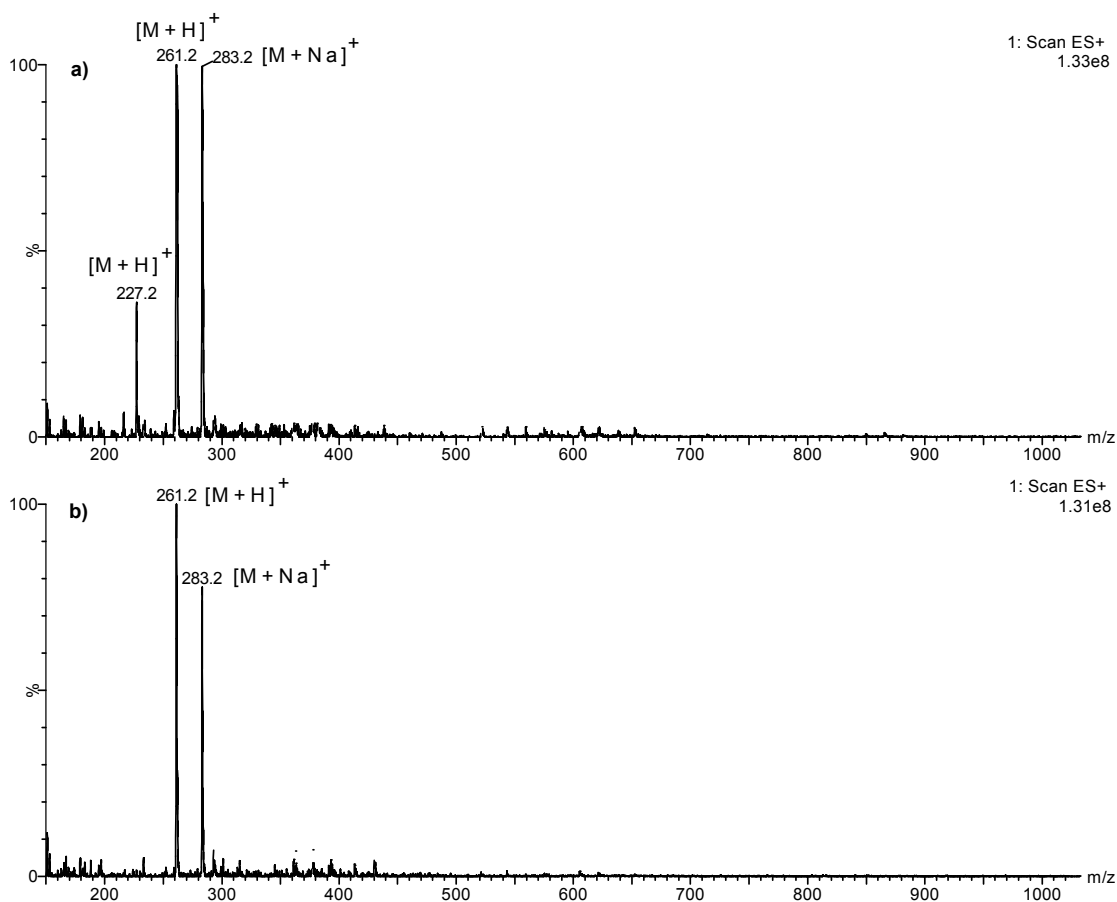


Figura 33 – Em (a) é mostrado o espectro de massas obtido do pico cromatográfico no $t_R = 19,60$ min e (b) o espectro de massas obtido do pico cromatográfico no $t_R = 19,99$ min

Como mostrado na Figura 33 (a e b), os compostos referentes aos picos de m/z 261 (pico base) e de m/z 283 intensos no espectro de massas se referem às moléculas protonadas $[M+H]^+$ e sodiadas $[M+Na]^+$, respectivamente, uma vez que a diferença de massa entre o íon precursor de m/z 261 e m/z 283 é de 22 u. Além do mais, no espectro de massas da Figura 33 (a), há outro composto de m/z 227, o qual não aparece no espectro de massas obtido a partir do pico no $t_R = 19,99$ min. Neste contexto, podemos inferir que provavelmente esses compostos são os responsáveis pela atividade biológica observada nas subfrações Fr 35 e Fr 36. Logo, essas frações foram agrupadas resultando na subfração ativa Fr 35-36. Esta subfração foi submetida ao experimento utilizando espectrometria de massas sequencial por CLUE-EM/EM, na tentativa de identificar estruturalmente esses compostos por meio dos seus respectivos espectros de íons produtos (EM/EM), conforme mostrado na Figura 34 (a e b).

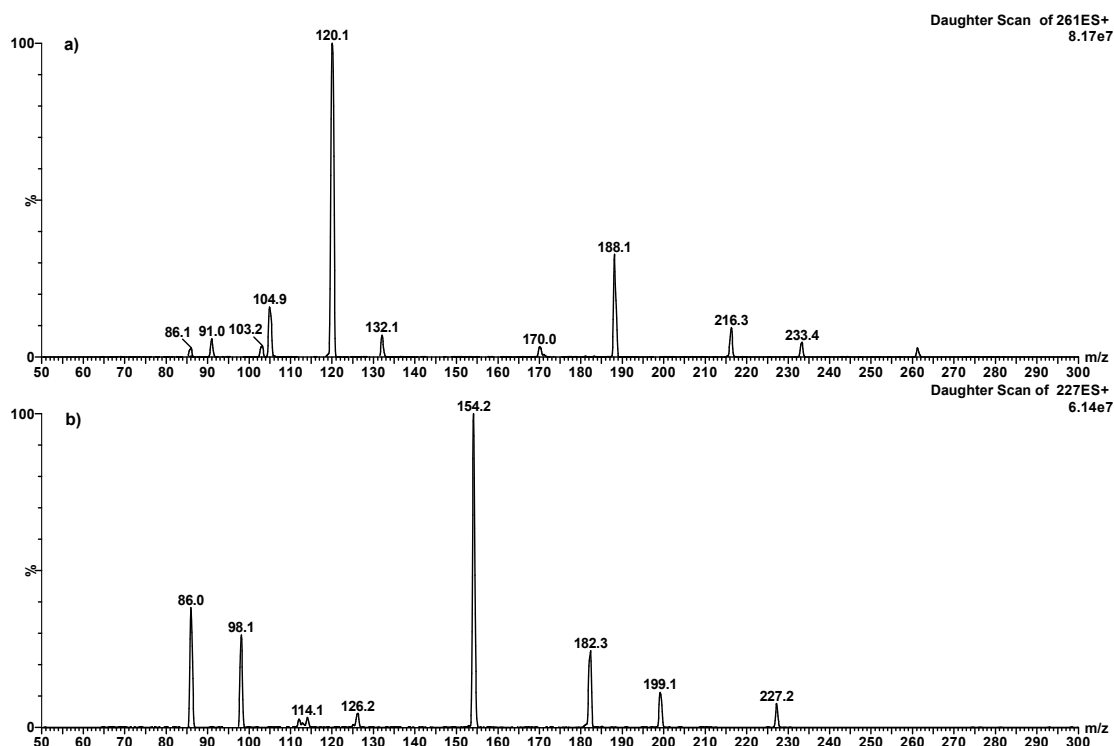


Figura 34 - Em (a) é mostrado o espectro de íons produtos obtido do íon precursor de m/z 261 e (b) o espectro de íons produtos obtido do íon precursor de m/z 227

A tentativa de identificação dos compostos foi realizada inicialmente por meio da busca no banco de dados do Dicionário de Produtos Naturais - DNP (versão online, acessado em maio 2016) através da massa molecular 260 u, e confrontando as informações obtidas com o gênero *Bacillus*, além da interpretação do espectro de ESI-EM/EM (Figura 34a) do íon precursor protonado de m/z 261. Dentre os compostos sugeridos pelo banco de dados, a presença de um dipeptídeo cíclico nos chamou a atenção. A razão principal foi devido ao seu espectro de ESI-EM/EM obtido em nossas análises, o qual foi observado uma primeira perda neutra de 28 u (CO), sendo comum a esses compostos. Contudo, o composto sugerido pelo banco de dados foi o ciclo-(Pro-Tir), onde Pro = Prolina e Tir = Tirosina e, de acordo com os dados da literatura (FURTADO et al., 2007), o espectro de fragmentação desse composto diferiu significativamente do espectro de fragmentação obtido em nosso experimento. Assim, as perdas neutras de 28 u e 18 u (H₂O) verificadas no espectro de fragmentação da Figura 34 (a) não forneceram informações estruturais suficientes para determinar a estrutura do composto de m/z 261. Na verdade, essas informações apenas nos informou a presença de compostos carbonilados e

oxigenados em sua estrutura. Desta forma, a subfração Fr 35-36 foi também analisada por CG-EM, a fim de determinar a constituição química presente nesta fração por meio de seus espectros de fragmentação obtidos por EI, em comparação com os espectros de fragmentação dos compostos presentes nas bibliotecas NIST-08 e Wiley contidas no *software* do equipamento. A Figura 35 mostra o cromatograma TIC obtido da análise por CG-EM.

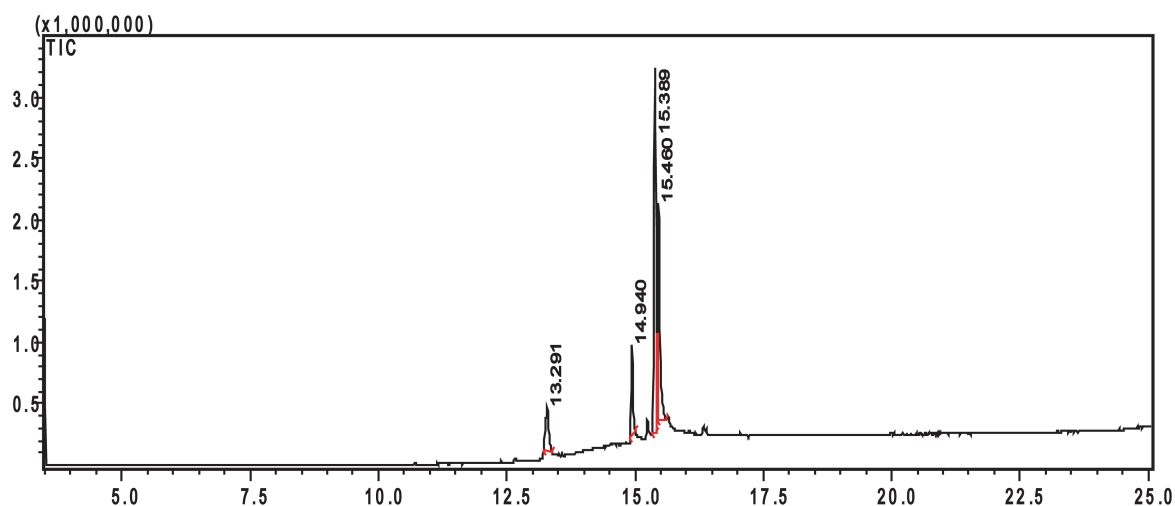


Figura 35 - Perfil cromatográfico obtido por CG-EM da subfração Fr 35-36

Conforme mostrado na Figura 35, os picos em $t_R = 13,291$ min, $t_R = 14,940$ min, $t_R = 15,389$ min e $t_R = 15,460$ min foram os principais picos presentes na análise por CG-EM. A comparação de seus espectros de fragmentação por EI com os espectros de fragmentação da literatura sugeriu realmente a presença de dipetídeos cíclicos da classe das dicetopiperazinas, como já mencionado anteriormente por meio dos resultados da análise por CLUE-EM/EM (Figura 34). Os resultados obtidos por CG-EM apontaram os seguintes compostos identificados (Figura 35): pico em $t_R = 13,291$ min – ciclo-(Leu/Ile-Leu/Ile) (índice de similaridade = 89%), onde Leu = Leucina e Ile = Isoleucina; pico em $t_R = 14,940$ min – ciclo-(Fen-Val) (índice de similaridade = 91%), onde Fen = Fenilalanina e Val = Valina; picos em $t_R = 15,389$ min e $15,460$ min – ciclo-(Leu/Ile-Fen) (índice de similaridade = 85%). Assim, o composto com a massa molecular de 260 u não se trata do ciclo-(Pro-Tir) como sugerido pelo banco de dados do DNP, mas do composto ciclo-(Leu/Ile-Fen) como mostrado nas análises por CG-EM. Para distinguir entre os possíveis isômeros de posição Leu ou Ile na estrutura desse composto, uma

amostra padrão do isômero da dicetopiperazina – ciclo-(Leu-Fen) foi analisada por GC-EM nas mesmas condições analíticas da subfração Fr 35-36. A Figura 36 (a-c) mostra a comparação de ambos cromatogramas juntamente com seus respectivos espectros de fragmentação por EI.

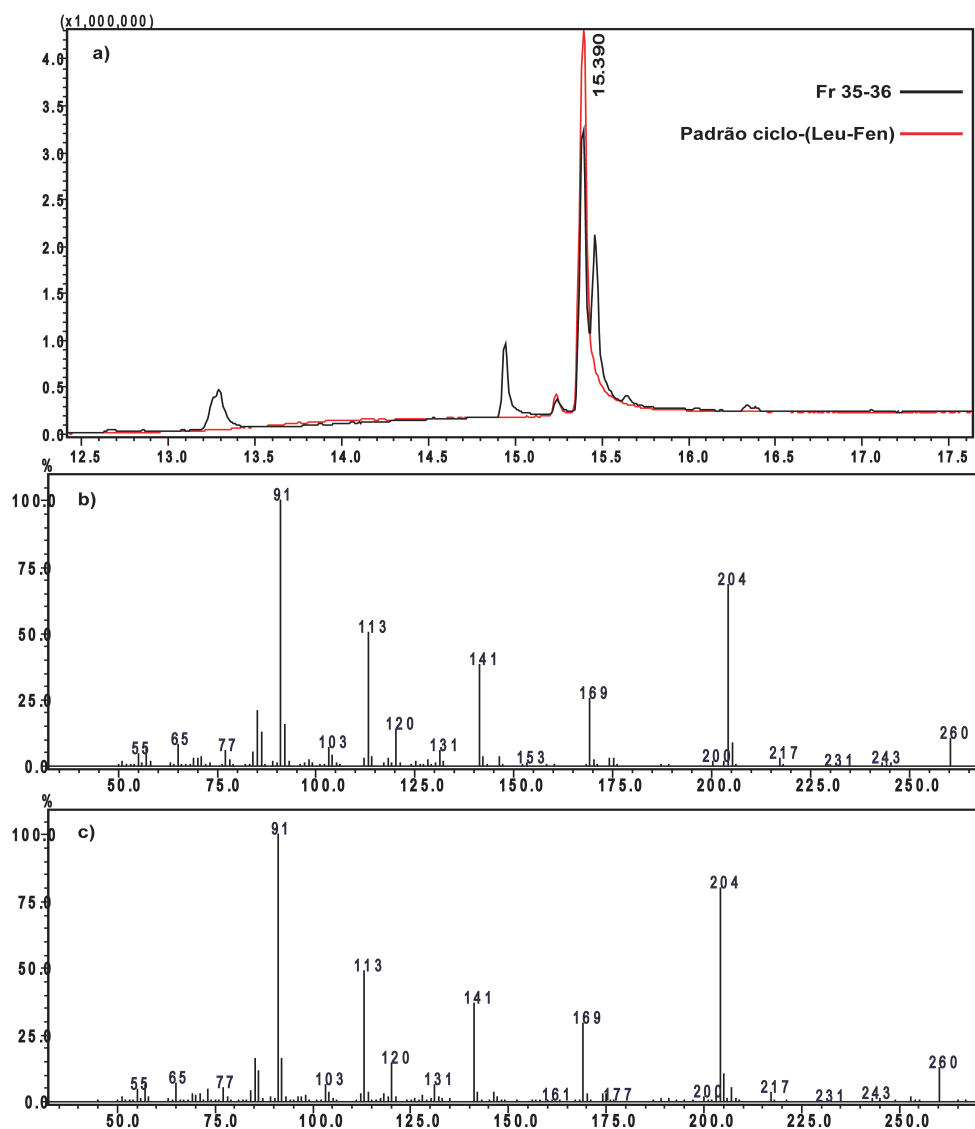


Figura 36 - Em (a) é mostrado os cromatogramas TIC obtido por CG-EM da subfração Fr 35-36 e da amostra padrão do ciclo-(Leu-Fen); b) Espectro de fragmentação da subfração Fr 35-36 no $t_R = 15,390$ min; c) Espectro de fragmentação da amostra padrão do ciclo-(Leu-Fen) no $t_R = 15,390$ min

Com base nos resultados obtidos da Figura 36 (a), o pico cromatográfico de ambas as amostras co-eluíram em $t_R = 15,390$ min e, o espectro de fragmentação

de ambos os compostos mostraram o mesmo padrão de fragmentação e intensidade dos íons produtos (Figura 36 b e c). Nesse caso, os resultados demonstram que provavelmente o pico em $t_R = 15,460$ min presente na subfração Fr 35-36 (Figura 35), se refere ao outro isômero de posição o ciclo-(Ile-Fen). Na verdade, o seu espectro de fragmentação mostrou praticamente os mesmos íons produtos observados para o ciclo-(Leu-Fen), mas com diferentes intensidades de alguns íons produtos, como mostrado na Figura 37.

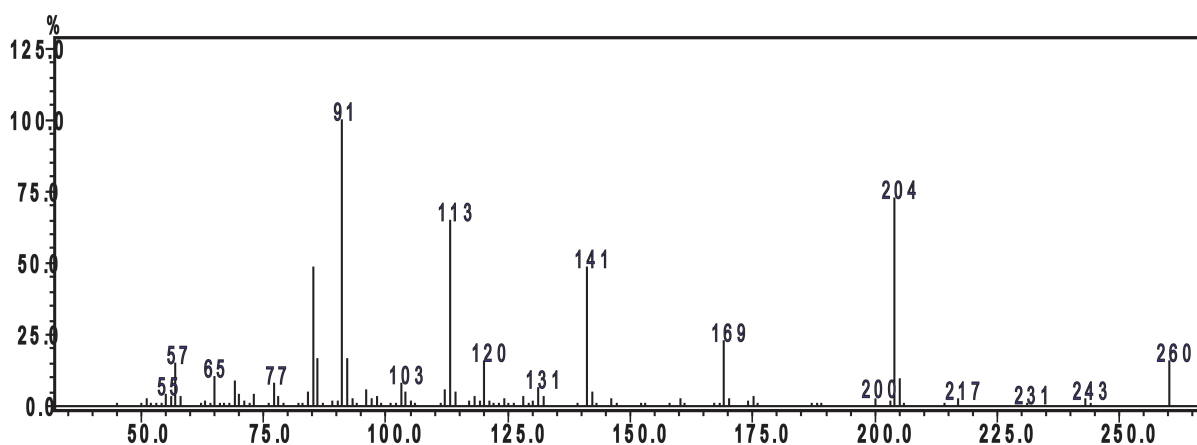


Figura 37 - Espectro de fragmentação obtido a partir do pico cromatográfico em $t_R = 15,460$ min na subfração Fr 35-36

A subfração Fr 35-36 foi analisada por CLUE-EM/EM empregando a metodologia de perda neutra de 28 u, seguido do experimento de íons produtos com intuito de identificar outros possíveis compostos pertencentes à classe das dicetopiperazinas. Assim, os resultados obtidos desta análise realmente corroboraram com os dados obtidos por CG-EM, pois, foi possível identificar as dicetopiperazinas já relatadas anteriormente, bem como outra dicetropiperazina cuja massa molecular é de 245 u, como mostrado na Figura 38.

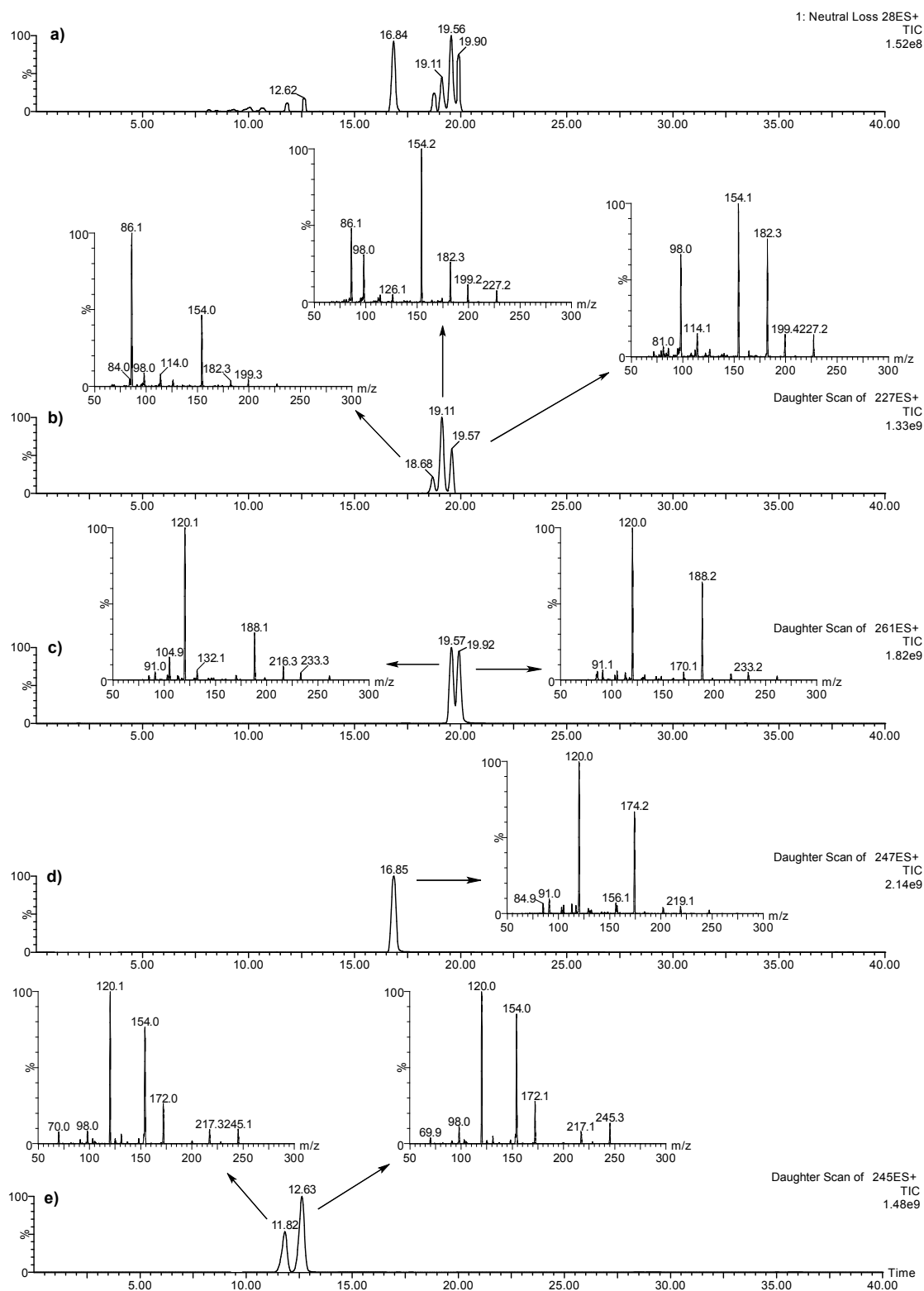


Figura 38 - Perfil cromatográfico obtido por CLUE-EM/EM a partir do experimento de perda neutra de 28 u da subfração Fr 35-36 (a). Perfis cromatográficos e espectros de íons produtos obtidos por CLUE-EM/EM da sub-fração Fr 35-36 (b-e) (íons precursores de m/z 227, m/z 261, m/z 247 e m/z 245, respectivamente)

A Figura 38 (a-e) mostra o perfil cromatográfico e os espectros de EM/EM obtidos nos experimentos de perda neutra e íons produtos da subfração Fr 35-36. A metodologia utilizada demonstra a capacidade analítica da técnica empregada, onde foi possível obter uma separação cromatográfica e identificação eficiente das dicetopiperazinas isoméricas, tais como: os picos em t_R = 18,68 min, 19,11 min e 19,57 min - ciclo-(Leu/Ile-Leu/Ile) (Figura 38 b), os picos em t_R = 19,57 min e 19,92 min – ciclo-(Leu/Ile-Fen) (Figura 38 c), o pico em t_R = 16,85 min – ciclo-(Val-Fen) (Figura 38 d), e os picos em t_R = 11,82 min e 12,63 min – ciclo-(Fen-Pro) (Figura 38 e). Para a identificação dos compostos, os espectros de íons produtos obtidos foram comparados com os previamente relatados na literatura (STARK; HOFMANN, 2005). Como pode ser observado nos espectros de fragmentação por EI, os espectros de íons produtos obtidos por CLUE-EM/EM das dicetopiperazinas isoméricas também possuem padrões de fragmentação semelhantes entre si, e intensidades diferentes de alguns íons produtos, dificultando assim, a identificação correta de cada isômero em seus respectivos tempos de retenção.

A subfração Fr 35-36, bem como os padrões de dicetopiperazinas ciclo (Leu-Fen), ciclo (Tyr-Tyr), ciclo (Fen-Tyr) e ciclo (Leu-Pro) foram testados individualmente, bem como uma mistura de todos eles frente a *P. aphanidermatum*, contudo, não foi observado uma significativa bioatividade. Este resultado, sugere que o isômero ciclo (Ileu-Fen) seja o responsável pela bioatividade apresentada. Além do mais, diversos autores destacam que as dicetopiperazinas isoméricas podem possuir diferentes sítios de ligação nas enzimas chaves, bem como diferentes configurações D- ou L- de resíduos dos aminoácidos, os quais afetam significativamente a bioatividade (MARTINS; CARVALHO, 2007; RUNGPROM et al., 2008; CARVALHO; ABRAHAM, 2012).

A análise por espectrometria de massas via inserção direta do extrato bruto de *Terrabacter* sp. ASPSP-140 revelou praticamente os mesmos picos presentes na faixa baixa de massa de m/z 150-300, como observado para o extrato bruto de ASPSP-434 (Figura 27 b). Aplicando a metodologia de perda neutra de 28 u utilizada para a subfração Fr 35-36, foi possível identificar as mesmas dicetopiperazinas presentes nesta fração, bem como outras duas contendo diferentes resíduos de aminoácidos, as quais possuem massa molecular de 210 u e 196 u. A identificação estrutural desses compostos foi realizada pela comparação de seus respectivos espectros de íons produtos (Figura 39) proveniente dos íons precursores de m/z 197

e m/z 211, com os espectros de íons produtos já relatados na literatura (STEEN; MANN, 2004; STARK; HOFMANN, 2005; KINTER; SHERMAN, 2005; CANTÚ et al., 2008; XING et al., 2008; GUO et al., 2009; HE et al., 2013) para o ciclo-(Leu/Ile-Pro) – 210 u e ciclo-(Val-Pro) – 197 u.

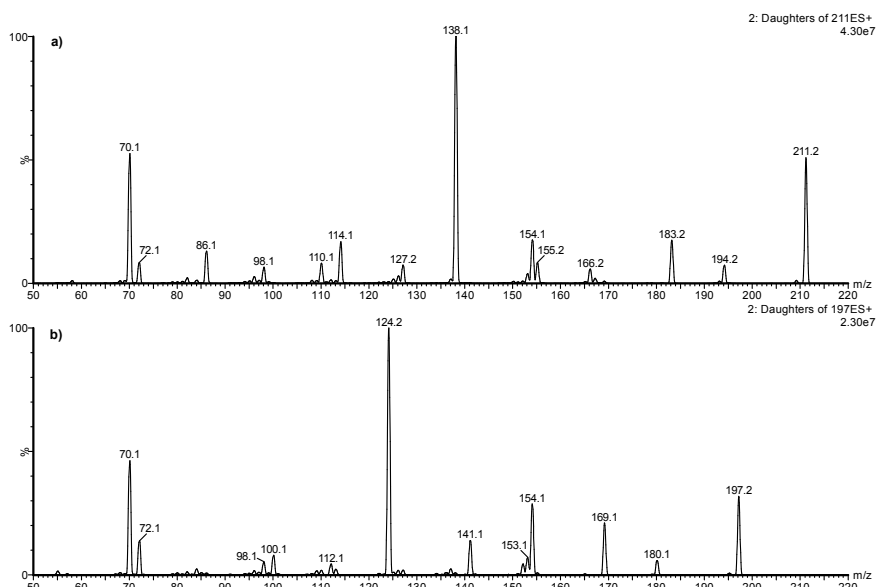


Figura 39 - Em (a) é mostrado o espectro de íons produtos obtido do íon precursor de m/z 211 e b) o espectro de íons produtos obtido do íon precursor de m/z 197

As estruturas químicas de cada uma das dicetopiperazinas identificadas nos extratos brutos de ASPSP-434 e ASPSP-140 estão mostradas na Figura 40.

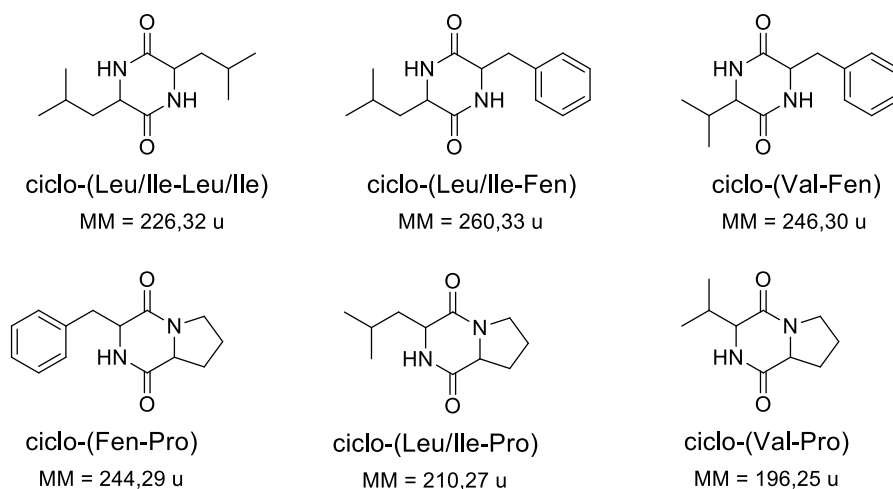


Figura 40 - Estrutura química das dicetopiperazinas identificadas nos extratos brutos, ASPSP-434 e ASPSP-140

Em relação à bioatividade do extrato ASPSP-140 frente a *P. aphanidermatum* (Figura 41), acredita-se que a bioatividade pronunciada no extrato bruto possa ser devido à presença das dicetopiperazinas em sua constituição química, em especial o ciclo-(Ile-Fen).

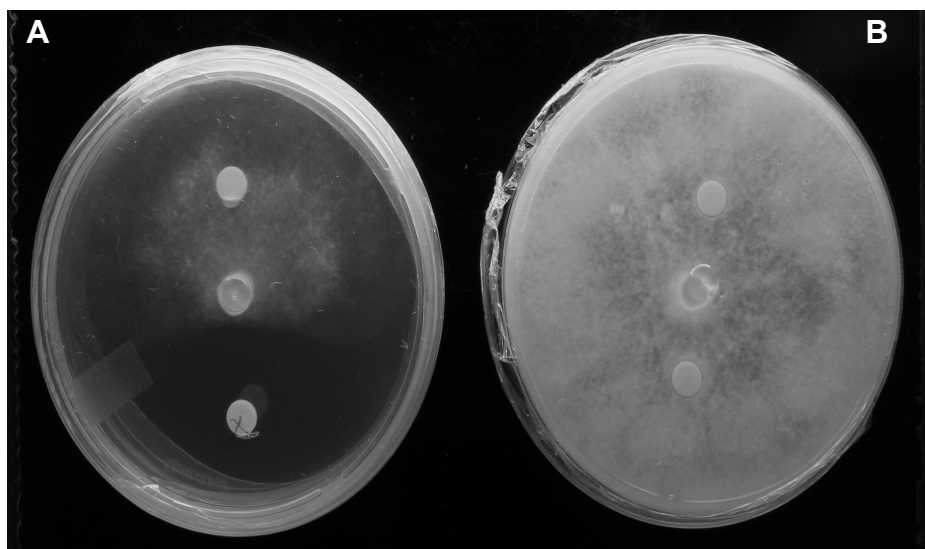


Figura 41 - Em (A), é mostrado a bioatividade contra *P. aphanidermatum* a partir do extrato da ASPSP 140, resultante do agrupamento de subfrações após fracionamento em coluna preparativa. B) é mostrado o livre crescimento de *P. aphanidermatum* utilizando discos impregnados com metanol e outra subfração que não apresentou bioatividade

7.4 Discussão

Investigações realizadas por outros autores colocaram em evidência às esponjas e seus microrganismos associados como as principais fontes de moléculas bioativas de origem marinha (TAYLOR et al., 2007; LAPORT et al., 2009). Neste estudo é mostrado que bactérias associadas com esponjas inibem o crescimento micelial de oomicetos fitopatogênicos de *P. aphanidermatum*, *P. graminicola* e *P. ultimum*. Esta observação também foi encontrada por Keller-Costa et al. (2014) que utilizaram *Pseudomonas* spp. associadas com a esponja *Ephydatia fluviatilis* para controlar o crescimento micelial de diversos fungos fitopatogênicos, incluindo o oomiceto *P. ultimum*. No entanto, estes mesmos autores não analisaram os possíveis compostos bioativos de extratos destas bactérias. Consequentemente, estes resultados impulsionam à busca por compostos ativos contra microrganismos

fitopatogênicos, uma vez que os oomicetos causam grandes perdas econômicas para agricultura e, especialmente, membros do gênero *Pythium* apresentam um grande risco para cultivos hidropônicos (CORRÊA; BETTIOL, 2009).

Para infectar as plantas hospedeiras, fitopatógenos como *Pythium* ssp. produzem assexuadamente esporos biflagelados, que são móveis, chamados de zoósporos (CORRÊA; BETTIOL, 2009). Diversos trabalhos indicam que a motilidade de zoósporos é uma etapa crítica no ciclo da doença (SOUZA et al., 2003; TAREQ et al., 2015). Quando os zoósporos encontram potenciais locais para infecção no hospedeiro, eles param de se mover, e atacam as raízes do hospedeiro. Em cultivo hidropônico o sucesso de infecção destes fitopatógenos pode ser atribuído, em parte, para a fácil locomoção de zoósporos na solução nutritiva (CORRÊA; BETTIOL, 2009). Portanto, qualquer quebra na motilidade de zoósporos, decresce significativamente o potencial de inóculo e, conseqüentemente, pode quebrar o ciclo da doença. Neste trabalho, os extratos brutos provenientes de *Bacillus* sp. ASPSP 434 e *Terrabacter* sp. ASPSP 140 foram capazes de afetar completamente a motilidade de zoósporos, em até 20 min após o contato com os extratos orgânicos. Ainda, os extratos avaliados permaneceram biologicamente ativos após aquecimento a 60 °C, uma temperatura a qual é comum em casas de vegetação durante o verão no Brasil.

Os possíveis compostos bioativos presentes nos extratos de cultivo destas bactérias foram identificadas utilizando a espectrometria de massas, como ferramenta analítica. Sendo assim, uma mistura de compostos da classe das dicetopiperazinas (DKPs), contendo o ciclo-(Leu/Ile-Leu/Ile), ciclo-(Val-Fen), ciclo-(Leu/Ile-Fen), ciclo-(Fen-Pro) foram purificadas após fracionamento guiado por bioensaio do extrato de cultivo de *Bacillus* sp. ASPSP 434. Ao mesmo tempo, estes mesmos compostos foram presentes no extrato bruto de *Terrabacter* sp. ASPSP 140, bem como outras duas dicetopiperazinas contendo ciclo-(Leu/Ile-Pro) e ciclo-(Val-Pro). Comparações de extratos ativos e inativos, bem como bioensaios durante o fracionamento do extrato de ASPSP 434 forneceram evidências que o ciclo-(Ile-Fen) poderia ser o principal responsável pela bioatividade. Estes resultados confirmam o grande potencial de bactérias associadas com esponjas como fonte de metabólitos secundários bioativos (TAYLOR et al., 2007; LAPORT et al., 2009).

As DKPs também conhecidas como dipeptídeos cíclicos são relativamente compostos simples e estáveis, portanto, de fácil síntese química (FISCHER, 2003;

KUMAR et al., 2014) e apresentam o potencial para inibição do crescimento de diversos fungos fitopatogênicos (RHEE, 2003; KUMAR; NAMBISAN, 2014). Devido a sua relativa simplicidade e estabilidade, as DKPs fornecem um excelente modelo para o desenvolvimento de produtos de interesse agrícola (PARK et al., 2011). Nesse sentido, estas substâncias podem também regular o crescimento de plantas, através de ação fitotóxica (GRIGOLETTO, 2015). Até o momento, existe um pedido de patente para uma formulação de agroquímicos contendo DKPs como os principais ingredientes ativos (PARK et al., 2011). Segundo os autores, esta formulação possui a propriedade de agir tanto como herbicida, quanto como inibidor do crescimento de fungos fitopatogênicos (PARK et al., 2011).

Neste trabalho, é a primeira vez que é descrito ciclo (Fen-Pro) produzido por *Terrabter* sp. associado com esponja marinha. Porém, esta DKP não é uma substância exclusiva da associação bactéria-esponja, pois foi encontrada em muitas bactérias, fungos, invertebrados e mamíferos coletados em diversos ambientes (PRASAD, 1995; RHEE, 2003; KUMAR et al., 2014; HUANG et al., 2010; EL-GENDY et al., 2015). O ciclo (Fen-Pro) foi primeiramente isolado de fonte natural no caldo de cultivo do fitopatógeno *Alternaria alternata* (STIERLE et al. 1988). Por sua vez, esta molécula é bem descrita na literatura e já foi relatada a sua ação fitotóxica, antifúngica, antibacteriana, antitumoral e reguladora de toxinas da cólera (GRAZ et al., 1999; STRÖM et al., 2002; BINA et al., 2013; DESRIAC et al., 2013).

Em contraste, o ciclo (Leu-Fen) foi relatado pela primeira vez em *Pseudoalteromonas* sp. associada à esponja marinha *Halisarca ectofibrosa* (RUNGPROM et al., 2008). No trabalho realizado por Rungprom et al. (2008) foi observado que frações do extrato de cultivo de *Pseudoalteromonas* sp. mostraram atividade antibacteriana contra linhagens patogênicas a humanos. Contudo, nenhuma das frações contendo exclusivamente o peptídeo cíclico, tampouco uma amostra sintética de ciclo (Leu-Fen) apresentaram qualquer bioatividade (RUNGPROM et al., 2008). No presente estudo, as frações contendo DKPs inibiram o crescimento micelial de *P. aphanidermatum*, mas o composto sintético ciclo (Leu-Fen) não apresentou bioatividade, assim como outras DKPs testadas. Outros pesquisadores têm também observado a ausência de atividade associada com metabólitos cíclicos, mesmo quando os metabólitos têm sido isolados de extratos que mostraram atividade anti-microbiana (JAYATILAKE et al., 1996; SHIN et al., 2003). Segundo Rungprom et al. (2008), isto pode ser atribuído a múltiplas

conformações dos anéis e diferentes sítios de ligação amida, trans ou cis, particularmente, em peptídeos cíclicos.

O interesse nos compostos contendo DKPs tem aumentado ao longo dos anos, devido, principalmente, a sua diversificada atividade biológica (BELIN et al., 2012). Como revisado por Martins e Carvalho (2007) diversos trabalhos relatam atividade citotóxica, antifúngica, antibiótica, antiviral e anticâncer de DKPs isoladas de microrganismos. Em nosso estudo, o extrato bruto de ASPSP 434 não apresentou significativa citotoxicidade frente a neonatos de *A. salina*. Em contraste, o extrato bruto proveniente de ASPSP 140 revelou uma significativa citotoxicidade, a qual poderá ser utilizada para testes frente a células tumorogênicas, contudo, não podemos afirmar que DKPs são os responsáveis pela citotoxicidade encontrada. Além do mais, a exploração da associação bactéria-esponja tem mostrado ser um campo prolífero de DKPs com diferentes conformações e bioatividade. Recentemente, uma DKP foi isolada de *Pseudomonas fluorescens* associada com esponjas e esse peptídeo apresentou potente bioatividade contra linhagens bacterianas multirresistentes (SANTOS et al., 2015). O papel biológico das DKPs em organismos que produzem estas substâncias permanece pobremente entendido (BELIN et al., 2012). Especula-se que algumas DKPs podem agir como pequenas moléculas envolvidas na comunicação celular, por processos similar a *quorum-sensing* (HOLDEN et al., 1999, 2000; MITOVA et al., 2004; DEGRASSI et al., 2002; ORTIZ-CASTRO et al., 2011).

Em conclusão, os extratos provenientes de duas diferentes linhagens bacterianas foram investigados e mostraram conter dipeptídeos cíclicos que controlam o crescimento micelial de fitopatógenos. Estes dados reforçam o potencial uso de bactérias associadas com esponjas marinhas para o controle de oomicetos pertencentes ao gênero *Pythium* e fornecem a base para o futuro desenvolvimento de novos fungicidas de baixo impacto ambiental. Contudo, mais estudos como ensaios em casa de vegetação e uma avaliação mais abrangente do impacto tóxico desses compostos no ambiente devem ser necessários, para viabilizar um possível fungicida contendo esta classe de compostos.

Referências

- ALVES FILHO, J.P. **Uso de agrotóxicos no Brasil: controle social e interesses corporativos**. São Paulo: Annablume, 2002. 188 p.
- BAUER, A.W.; ROBERTS, C.E.; KIRBY, W.M.M. Single disc antibiotic versus multiple disc and plate dilution techniques for antibiotic sensitivity testing. In: FILHO J.P.A. **Antibiotics annual 1959/60**. New York: Medical Encyclopedia, 1960. p. 574–580.
- BELIN, P.; MOUTIEZ, M.; LAUTRU, S.; SEGUIN, J.; PERNODET, J.L.; GONDRY, M. The nonribosomal synthesis of diketopiperazines in tRNA-dependent cyclodipeptide synthase pathways. **Natural Product Reports**, London, v. 29, n. 9, p. 961-979, 2012.
- BINA, X.R.; TAYLOR, D.L.; VIKRAM, A.; ANTE, V.M.; BINA, J.E. *Vibrio cholerae* ToxR downregulates virulence factor production in response to cyclo (Phe-Pro). **MBio**, Washington, v. 4, n. 5, p. e00366-13, 2013.
- CANOVA, S.P.; PETTA, T.; REYES, L.F.; ZUCCHI, T.D.; MORAES, L.A.B.; MELO, I.S. Characterization of lipopeptides from *Paenibacillus* sp. (IIRAC30) suppressing *Rhizoctonia solani*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 26, n. 12, p. 2241-2247, 2010.
- CANTÚ, M.D.; CARRILHO, E.; WULFF, N.A.; PALMA, M.S. Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 3, p. 669-675, 2008.
- CARNEIRO, F.F.; RIGOTTO, R.M.; AUGUSTO, L.G.D.S.; FRIEDRICH, K.; BURIGO, A.C. **ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Rio de Janeiro: Aicó Culturas, 2015. 140 p.
- CARVALHO, M.P.; ABRAHAM, W.R. Antimicrobial and biofilm inhibiting diketopiperazines. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v. 19, n. 21, p. 3564-3577, 2012.
- CERDEIRA, A.L.; PARAÍBA, L.C.; QUEIROZ, S.C.N.; MATALLO, M.B.; FRANCO, D.A.S.; FERRACINI, V.L. Estimation of herbicide bioconcentration in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 45, p. 591-597, 2015.
- CORRÊA, E.B.; BETTIOL, W. **Controle biológico da podridão de raízes causada por *Pythium spp.* em cultivos hidropônicos**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. 26 p. (Documentos, 77).
- CORRÊA, É.B.; BETTIOL, W.; SUTTON, J.C. Controle biológico da podridão radicular (*Pythium aphanidermatum*) e promoção de crescimento por *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 e *Bacillus subtilis* GB03 em alface hidropônica. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 36, n. 4, p. 275-281, 2010.

CREVELIN, E.J.; CANOVA, S.P.; MELO, I.S.; ZUCCHI, T.D.; DA SILVA, R.E.; MORAES, L.A.B. Isolation and characterization of phytotoxic compounds produced by *Streptomyces* sp. AMC 23 from Red Mangrove (*Rhizophora mangle*). **Applied biochemistry and biotechnology**, Clifton, v. 171, n. 7, p. 1602-1616, 2013.

DEGRASSI, G.; AGUILAR, C.; BOSCO, M.; ZAHARIEV, S.; PONGOR, S.; VENTURI, V. Plant growth-promoting *Pseudomonas putida* WCS358 produces and secretes four cyclic dipeptides: cross-talk with quorum sensing bacterial sensors. **Current Microbiology**, New York, v. 45, n. 4, p. 250-254, 2002.

DESRIAC, F.; JÉGOU, C.; BALNOIS, E.; BRILLET, B.; CHEVALIER, P.L.; FLEURY, Y. Antimicrobial peptides from marine proteobacteria. **Marine Drugs**, Basel, v. 11, n. 10, p. 3632-3660, 2013.

DEVI, P.; WAHIDULLAH, S.; RODRIGUES, C.; SOUZA, L. D. The sponge-associated bacterium *Bacillus licheniformis* SAB1: a source of antimicrobial compounds. **Marine Drugs**, Basel, v. 8, n. 4, p. 1203-1212, 2010.

DICTIONARY of natural products. Disponível em: <<http://dnpc.chemnetbase.com/dictionarysearch.do?method=view&id=11039637&props=&struct=start&si=>>>. Acesso em: 15 maio 2016.

DOBSON, A.D.W.; JACKSON, S.A.; KENNEDY, J.; MARGASSERY, L.M.; FLEMER, B.; O'LEARY, N.; MORRISSEY, J.P.; O'GARA, F. Marine sponges—molecular biology and biotechnology. In: KIM S.K. **Springer handbook of marine biotechnology**. Berlin; Heidelberg: Springer, 2015. p. 219-254.

EL AMRAOUI, B.; EL WAHIDI, M.; FASSOUANE, A. In vitro screening of antifungal activity of marine sponge extracts against five phytopathogenic fungi. **SpringerPlus a SpringerOpen Journal**, Switzerland, v. 3, n. 1, p. 1-5, 2014.

EL-GENDY, B.E.D.M.; RATEB, M.E. Antibacterial activity of diketopiperazines isolated from a marine fungus using t-butoxycarbonyl group as a simple tool for purification. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 25, n. 16, p. 3125-3128, 2015.

FISCHER, P.M. Diketopiperazines in peptide and combinatorial chemistry. **Journal of Peptide Science**, Chichester, v. 9, n. 1, p. 9-35, 2003.

FURTADO, N.A.; VESSECCHI, R.; TOMAZ, J.C.; GALEMBECK, S.E.; BASTOS, J.K.; LOPES, N.P.; CROTTI, A. . Fragmentation of diketopiperazines from *Aspergillus fumigatus* by electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS). **Journal of Mass Spectrometry**, Chichester, v. 42, n. 10, p. 1279-1286, 2007.

GRAZ, M.; HUNT, A.; JAMIE, H.; GRANT, G.; MILNE, P. Antimicrobial activity of selected cyclic dipeptides. **Die Pharmazie**, Berlin, v. 54, n. 10, p. 772-775, 1999.

GRIGOLETO, T.L.B. **Estudos de metabolômica de actinobacterias aplicados à identificação de fitotoxinas com potencial aplicação como herbicidas empregando espectrometria de massas**. 2015. 137 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Filosofia Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

GUO, Y.C.; CAO, S.X.; ZONG, X.K.; LIAO, X.C.; ZHAO, Y.F. ESI-MSⁿ study on the fragmentation of protonated cyclic-dipeptides. **Spectroscopy**, Cairo, v. 23, n. 3/4, p. 131-139, 2009.

HENTSCHEL, U.; SCHMID, M.; WAGNER, M.; FIESELER, L.; GERNERT, C.; HACKER, J. Isolation and phylogenetic analysis of bacteria with antimicrobial activities from the Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 35, n. 3, p. 305-312, 2001.

HE, R.; WANG, B.; WAKIMOTO, T.; WANG, M.; ZHU, L.; ABE, I. Cyclodipeptides from metagenomic library of a Japanese marine sponge. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Campinas, v. 24, n. 12, p. 1926-1932, 2013.

HOLDEN, M.T.; RAM CHHABRA, S.; DE NYS, R.; STEAD, P.; BAINTON, N.J.; HILL, P.J.; MANEFIELD, M.; KUMAR, N.; LABATTE, M.; ENGLAND, D.; RICE, S.; GIVSKOV, M.; SALMOND, G.P.C.; STEWART, G.S.A.B.; BYCROFT, B.W.; KJELLEBERG, S.; WILLIAMS, P. Quorum-sensing cross talk: isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative bacteria. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 33, n. 6, p. 1254-1266, 1999.

HOLDEN, M.; SWIFT, S.; WILLIAMS, P. New signal molecules on the quorum-sensing block. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 8, p. 101-103, 2000.

HUANG, R.; ZHOU, X.; XU, T.; YANG, X.; LIU, Y. Diketopiperazines from marine organisms. **Chemistry & Biodiversity**, Zürich, v. 7, n. 12, p. 2809-2829, 2010.

JAYATILAKE, G.S.; THORNTON, M.P.; LEONARD, A.C.; GRIMWADE, J.E.; BAKER, B.J. Metabolites from an Antarctic sponge-associated bacterium, *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 59, n. 3, p. 293-296, 1996.

KANCHISWAMY, C.N.; MALNOY, M.; MAFFEI, M.E. Bioprospecting bacterial and fungal volatiles for sustainable agriculture. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 20, n. 4, p. 206-211, 2015.

KELLER-COSTA, T.; JOUSSET, A.; VAN OVERBEEK, L.; VAN ELSAS, J.D.; COSTA, R. The freshwater sponge *Ephydatia fluviatilis* Harbours diverse *Pseudomonas* species (Gammaproteobacteria, Pseudomonadales) with broad-spectrum antimicrobial activity. **PloS One**, San Francisco, v. 9, n. 2, p. e88429, 2014.

KINTER, M.; SHERMAN, N.E. **Protein sequencing and identification using tandem mass spectrometry**. New York: John Wiley, 2005. 167 p.

KUMAR, S.N.; DILEEP, C.; MOHANDAS, C.; NAMBISAN, B.; CA, J. Cyclo (d-Tyr-d-Phe): a new antibacterial, anticancer, and antioxidant cyclic dipeptide from *Bacillus* sp. N strain associated with a rhabditid entomopathogenic nematode. **Journal of Peptide Science**, Chichester, v. 20, n. 3, p. 173-185, 2014.

KUMAR, S.N.; NAMBISAN, B. Antifungal activity of diketopiperazines and stilbenes against plant pathogenic fungi in vitro. **Applied biochemistry and biotechnology**, Clifton, v. 172, n. 2, p. 741-754, 2014.

LAPORT, M.S.; SANTOS, O.C.S.; MURICY, G. Marine sponges: potential sources of new antimicrobial drugs. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, Hilversum, v. 10, n. 1, p. 86-105, 2009.

MARTINS, M.B.; CARVALHO, I. Diketopiperazines: biological activity and synthesis. **Tetrahedron**, Oxford, v. 63, n. 40, p. 9923-9932, 2007.

MELO, I.S.; SOUZA, W.R.; SILVA, L.J.; SANTOS, S.N.; ASSALIN, M.R.; ZUCCHI, T.D.; QUEIROZ, S.C. Antifungal activity of *Pseudomonas frederiksbergensis* CMAA 1323 Isolated from the Antarctic hair grass *Deschampsia antarctica*. **British Microbiology Research Journal**, Gurgaon, v. 14, n. 3, p.1-11, 2016.

MITOVA, M.; POPOV, S.; DE ROSA, S. Cyclic peptides from a *Ruegeria* strain of bacteria associated with the sponge *Suberites domuncula*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 67, n. 7, p. 1178-1181, 2004.

ORTIZ-CASTRO, R.; DÍAZ-PÉREZ, C.; MARTÍNEZ-TRUJILLO, M.; ROSA, E.; CAMPOS-GARCÍA, J.; LÓPEZ-BUCIO, J. Transkingdom signaling based on bacterial cyclodipeptides with auxin activity in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 108, n. 17, p. 7253-7258, 2011.

PARK, K.S.; PARK, J.W.; LEE, S.Y.; MOON, S.S.; HONG, I.S. **Agricultural agent containing 2, 5-diketopiperazine derivative as active ingredient**. U.S. Patent Application n. 13/810,163, 14 jul. 2011.

PRASAD, C. Bioactive cyclic dipeptides. **Peptides**, New York, v. 16, n. 1, p. 151-164, 1995.

QUEIROZ, S.C.N.; FERRACINI, V.L.; ROSA, M.A. Validação de método multirresíduo para determinação de pesticidas em alimentos empregando QuEChERS E UPLC-MS/MS. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, p. 185-192, 2012.

QUEIROZ, S.C.N.; PARAIBA, L.; CERDEIRA, A.; MATALLO, M.; FRANCO, D.; FERRACINI, V.L. Tebuthiuron herbicide bioconcentration in sugarcane plants. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 180, p. S198, 2008.

RAHIMIAN, M.K.; BANIHASHEMI, Z. A method for obtaining zoospores of *Pythium aphanidermatum* and their use in determining cucumber seedling resistance to damping-off. **Plant Disease Report**, St. Paul, v. 63, p.658-661, 1979.

RHEE, K.H. Purification and identification of an antifungal agent from *Streptomyces* sp. KH-614 antagonistic to rice blast fungus, *Pyricularia oryzae*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 13, n. 6, p. 984-988, 2003.

RUNGROM, W.; SIWU, E.R.; LAMBERT, L.K.; DECHSAKULWATANA, C.; BARDEN, M.C.; KOKPOL, U.; BLANCHFIELD, J.T.; KITA, M.; GARSON, M.J. Cyclic tetrapeptides from marine bacteria associated with the seaweed *Diginea* sp. and the sponge *Halisarca ectofibrosa*. **Tetrahedron**, Oxford, v. 64, n. 14, p. 3147-3152, 2008.

SANTOS, O.C.S.; SOARES, A.R.; MACHADO, F.L.S.; ROMANOS, M.T.V.; MURICY, G.; GIAMBIAGI-DEMARVAL, M.; LAPORT, M. S. Investigation of biotechnological potential of sponge-associated bacteria collected in Brazilian coast. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 60, n. 2, p. 140-147, 2015.

SHIN, J.; SEO, Y.; LEE, H.S.; RHO, J.R.; MO, S.J. A new cyclic peptide from a marine-derived bacterium of the genus *Nocardiopsis*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 66, n. 6, p. 883-884, 2003.

SILVA, F.S.P. **Bioprospecção de actinobactérias associadas à esponja marinha *Aplysina fulva*: isolamento, caracterização e produção de compostos bioativos**. 2015. 159 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

SILVA, L.J.; CREVELIN, E.J.; SOUZA, W.R.; MORAES, L.A.B.; MELO, I.S.; ZUCCHI, T.D. *Streptomyces araujoniae* produces a multiantibiotic complex with ionophoric properties to control *Botrytis cinerea*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 104, n. 12, p. 1298-1305, 2014.

SOUZA, J.T.; DE BOER, M.; DE WAARD, P.; VAN BEEK, T.A.; RAAIJMAKERS, J.M. Biochemical, genetic, and zoosporicidal properties of cyclic lipopeptide surfactants produced by *Pseudomonas fluorescens*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 12, p. 7161-7172, 2003.

STARK, T.; HOFMANN, T. Structures, sensory activity, and dose/response functions of 2, 5-diketopiperazines in roasted cocoa nibs (*Theobroma cacao*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, n. 18, p. 7222-7231, 2005.

STEEN, H.; MANN, M. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. **Nature Reviews Molecular cell biology**, London, v. 5, n. 9, p. 699-711, 2004.

STIERLE, A.C.; CARDELLINA, J.H.; STROBEL, G.A. Maculosin, a host-specific phytotoxin for spotted knapweed from *Alternaria alternata*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 85, n. 21, p. 8008-8011, 1988.

STRÖM, K.; SJÖGREN, J.; BROBERG, A.; SCHNÜRER, J. *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo (L-Phe-L-Pro) and cyclo (L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid. **Applied and environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 9, p. 4322-4327, 2002.

TAREQ, F.S.; HASAN, C.M.; LEE, H.S.; LEE, Y.J.; LEE, J.S.; SUROVY, M.Z.; ISLAM, M.T.; SHIN, H.J. Gageopeptins A and B, new inhibitors of zoospore motility of the phytopathogen *Phytophthora capsici* from a marine-derived bacterium *Bacillus* sp. 109GGC020. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, Oxford, v. 25, n. 16, p. 3325-3329, 2015.

TAYLOR, M.W.; RADAX, R.; STEGER, D.; WAGNER, M. Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology, and biotechnological potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 71, n. 2, p. 295-347, 2007.

THOMAS, T.R.A.; KAVLEKAR, D.P.; LOKABHARATHI, P.A.A. Marine drugs from sponge-microbe association: a review. **Marine Drugs**, Basel, v. 8, n. 4, p. 1417-1468, 2010.

XING, J.; YANG, Z.; LV, B.; XIANG, L. Rapid screening for cyclo-dopa and diketopiperazine alkaloids in crude extracts of *Portulaca oleracea* L. using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Chichester, v. 22, n. 9, p. 1415-1422, 2008.

8 CONCLUSÕES FINAIS

1 – Esponjas marinhas do mesmo grupo filogenético abrigam mais similar comunidades bacterianas, do que quando comparado com as comunidades em um táxon filogeneticamente mais distante, sugerindo que as comunidades bacterianas são moldadas pela história evolutiva dos hospedeiros.

2 – Análises dependentes e independentes de cultivo permitiram a descrição detalhada das comunidades bacterianas associadas às esponjas *Didiscus oxeata* e *Scopalina ruetzleri*.

3 – À esponja *D. oxeata* possui uma comunidade bacteriana mais diversa e altamente específica, quando comparado as comunidades associadas à *S. ruetzleri*.

4 – Uma nova espécie do gênero *Saccharopolyspora* foi descrita, usando taxonomia polifásica, ao qual foi proposto o nome *Saccharopolyspora spongiae* sp. nov., suportando a hipótese de que esponjas marinhas são valiosos recursos para o isolamento de novos táxons.

5 – Metabólitos extracelulares provenientes de duas diferentes linhagens bacterianas, assim identificadas como pertencentes aos gêneros *Terrabacter* sp. e *Bacillus* sp., contêm uma mistura de dipeptídeos cíclicos que inibem o crescimento micelial de oomicetos fitopatogênicos.

ANEXOS

Anexo A

Tabela 1 - Número de sequências e UTOs após processamento dos dados das esponjas *Aiolochoia crassa* (AC), *Aplysina fulva* (AF), *Chondrosia collectrix* (CC) e amostras da água do mar (SW)

ID	Sequências	Sequências	Sequências	Sequências	UTOs	UTOs
Amostras	brutas	filtradas	excluídas ¹	finais	finais	únicas ²
AF1.R1	4.668	381	492	3.795	262	616
AF.1.R2	3.651	247	364	3.040	253	
AF.1.R3	7.404	525	1.279	5.600	342	
AF.1.R4	6.789	493	373	5.923	239	
AC.1.R1	9.569	594	2.787	6.188	359	633
AC.1.R2	4.494	295	1.070	3.129	258	
AC.1.R3	8.744	499	2.264	5.981	426	
AC.1.R4	4.688	326	532	3.830	246	
CC.1.R1	9.576	1.031	2.059	6.486	315	547
CC.1.R2	7.548	456	1.118	5.974	307	
CC.1.R3	11.721	1.766	2.290	7.665	359	
CC.1.R4	9.022	509	2.153	6.360	306	
SW.1.R1	8.038	619	2.363	5.056	328	853
SW.1.R2	8.178	559	1.602	6.017	457	
SW.1.R3	9.188	654	1.578	6.956	480	
SW.1.R4	6.901	533	2.080	4.288	504	
Total	120.179	9.487	24.404	86.288	2.112	

1 Exclusão de sequências indesejadas: classificadas como cloroplasto e mitocôndria, quimera, *singletons*, que falharam para o alinhamento NAST e com nenhuma classificação taxonômica em nível de domínio ("no-blast hit"). 2 UTOs únicas a partir de cada conjunto de dados por tratamento

Tabela 2 - Composição dos diferentes meios de cultura utilizados para o isolamento de bactérias heterotróficas associadas com esponjas marinhas

Nome do meio de cultura	Composição química do meio de cultivo*	Referência
M1	ágar 15 g; amido 10 g; extrato de levedura 4 g; peptona 2g; novobiocina 5 µg/ml; Nistatina 30 µg/ml	ROWBOTHAM; CROSS, 1977
SM3	ágar 15 g; D-glicose 10 g; peptona 5 g; triptona 3 g; cloreto de sódio 5 g; nistatina µg/ml	TAN et al. 2006
410	ágar 15 g; glicose 10 g; glicerol 10 g; extrato de levedura 5 g carbonato de cálcio CaCO ₃ 1 g; aveia 5 g; caseína ácida hidrolisada 15 g peptona 10 g; novobiocina 5 µg/ml; nistatina µg/ml	GOODFELLOW; FIEDLER, 2010
HVA	ágar 15 g; ácido húmico 1 g; fosfato dissódicododecahidratado de hidrogénio (Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O) 0,50 g; cloreto de potássio (KCl) 1,70 g; sulfato ferroso heptahidratado (FeSO ₄ .7H ₂ O) 0,10 g; solução de vitaminas 1 g; carbonato de cálcio (CaCO ₄) 0,01 g; tiamina 0,10 g; riboflavina 0,10 g; ácido nicotínico 0,10 g; piridoxina HCL 0,10 g; inositol 0,10 g; ácido pantotênico 0,10 g; ácido p-aminobenzóico 0,10 g; biotina 0,05 g; nistatina 50 µg/ml	(HAYAKAWA; NONOMURA, 1987)

* Todos os meios de cultura foram preparados com 33 g L⁻¹ de água marinha artificial, Red Sea Salt